

Diplôme d'Etudes Approfondies de Ressources Phytogénétiques et Interactions biologiques

Ecole Doctorale Biologie Intégrative

CONTRIBUTION A L'ETUDE DE LA MOSAÏQUE DE LA CANNE A SUCRE :

- VARIABILITE DU POUVOIR PATHOGENE DU *SUGARCANE MOSAIC VIRUS* ORIGINAIRES DU CAMEROUN ET DU CONGO
- CARACTERISATION D'ISOLATS VIRAUX D'ASIE

Candy Mazarin

Responsables de stage :
Philippe Rott
Girard Jean-Claude

Programmes Protection des cultures et
Canne à sucre, CIRAD-Montpellier

Soutenu à Montpellier
Le 31 Aout 2001

Remerciements

Je remercie très sincèrement M Philippe Rott de m'avoir accordé sa confiance et accueillie au sein de son équipe pendant ces huit mois. Son encadrement scientifique, son efficacité et sa disponibilité, m'ont permis de mener à bien ce sujet exaltant par la pluralité de ses aspects.

Toute ma gratitude va vers M Jean-Claude Girard, qui a su montrer un grand intérêt à ce stage et une grande disponibilité.

Je souhaite remercier toute l'équipe du laboratoire de pathologie de la canne à sucre, pour son appui technique et scientifique, notamment Mme Michèle Chatenet, M Marc Muller et Mme Marie-Josée Darroussat. Ils ont su m'aider à toutes les étapes clés de mon stage. Je ne saurais oublier la bonne humeur de cette équipe, et les « pauses café » autour des merveilleux gâteaux.

Je tiens à remercier également, M Daniel Gargani pour sa participation active et sa patience en microscopie électronique, Mme Catherine Remondat pour son aide précieuse dans tous mes travaux de bureautique.

Mes derniers remerciements s'adressent à Mme Marie-Line Caruana, M Michel Peterschmitt et Mme Véronique Marie-Jeanne qui ont su être disponibles malgré leur activités multiples.

A ma famille, toujours présente...

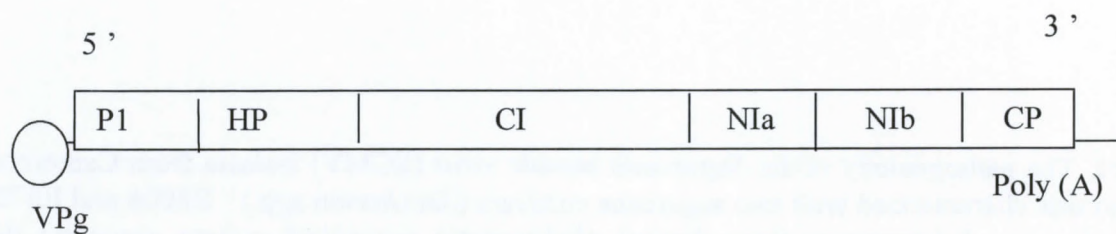
Ce mémoire a été rédigé selon le modèle de la revue Plant Disease.

Résumé. Le pouvoir pathogène de six isolats du *Sugarcane mosaic virus* (SCMV), originaires du Cameroun et du Congo, a été caractérisé à l'aide de deux variétés de canne à sucre (*Saccharum* spp.) : B8008 et R570. Ces six isolats appartiennent à trois groupes/sous-groupes phylogénétiques différents et sont représentatifs de la diversité génétique du SCMV dans ces deux pays africains. Quatre essais différés dans le temps ont été réalisés en conditions contrôlées. La symptomatologie, ainsi que la progression de la maladie, ont été étudiées pendant huit semaines après inoculation des plants de canne à sucre. Les six isolats étaient pathogènes dans tous les essais sur la variété B8008, mais l'intensité des symptômes et leur gravité étaient variables en fonction de l'isolat, de la date d'observation des symptômes et de l'essai. En revanche, un seul isolat (Con98/1) était très pathogène et a toujours provoqué des symptômes sur la variété R570, quel que soit l'essai. Une très bonne relation entre la présence de symptômes et la présence du virus dans différentes feuilles de la plante a été observée. En revanche, une relation simple entre l'appartenance à un groupe/sous-groupe phylogénétique et le caractère qualitatif et/ou quantitatif du pouvoir pathogène de ce virus n'a pas été mise en évidence. Six isolats viraux responsables de mosaïque en Asie ont provoqué des symptômes sur canne à sucre, maïs et sorgho après une transmission mécanique. En microscopie électronique, ils ont présenté des particules virales de forme filamenteuse et ayant une taille similaire à celle des membres de la famille des *Potyviridae*. Pak155/1 est le seul isolat qui ait réagi avec un sérum anti-*Potyvirus* et un sérum anti-SCMV. C'était aussi le seul isolat pour lequel une région génomique codant pour la protéine de capsid a été amplifiée par RT-PCR à l'aide d'amorces spécifiques des *Potyvirus* et du SCMV. Cet isolat originaire du Pakistan appartient donc à l'espèce SCMV et au genre *Potyvirus*. La position taxonomique des cinq autres isolats reste encore à préciser.

Abstract. The pathogenicity of six *Sugarcane mosaic virus* (SCMV) isolates from Cameroon and Congo was characterized with two sugarcane cultivars (*Saccharum* spp.) : B8008 and R570. These six isolates, belonging to three distinct phylogenetic groups/sub-groups, represent the genetic diversity of SCMV in Cameroon and Congo. Four experiments were undertaken at different dates, in a controlled environment. Symptoms and disease progress were studied for eight weeks after inoculation of sugarcane plants. All the virus isolates induced symptoms on cultivar B8008. However, symptom expression and severity varied with isolates, dates of observations and the experiment. In contrast, only one isolate (Con98/1) was highly pathogenic and was able to produce symptoms on cultivar R570 in all experiments. A very good relationship was observed between presence of symptoms and presence of the virus in the plant. However, no relationship between pathogenicity and phylogenetic grouping was shown. Six virus isolates causing mosaic disease in Asia induced symptoms in sugarcane, maize and sorghum. The size and filamentous form of the virus particles of all isolates were similar to those of the *Potyviridae*. Pak155/1 was the only isolate that reacted with an anti-*Potyvirus* serum and an anti-SCMV serum. Furthermore, it was the only isolate from which a genome region coding the coat protein was amplified by RT-PCR using primers specific to *Potyvirus* and to SCMV. It was concluded that this virus isolate from Pakistan belongs to the SCMV species and the *Potyvirus* genus. The taxonomic status of the five other virus isolates remains to be specified.



Figure 1 : Symptômes de mosaïque observés sur la canne à sucre : aires chlorotiques vert pâle distribuées sur le limbe.



Protéine de capside (CP) : encapsidation du génome, transmission par pucerons, mouvement de cellule à cellule et à longue distance des particules virales.

Protéine d'inclusion (NIb) : RNA polymérase.

Protéine d'inclusion (NIa) : Protéinase liée à l'ARN viral (VPg) ; NIa-VPg amplification du génome.

Protéine d'inclusion cylindrique (CI) : hélicase.

Facteur assistant /protéinase (HP) : mouvement à longue distance

Protéinase P1 : amplification du génome

Figure 2 : Organisation du génome des *Potyvirus*.

La canne à sucre (*Saccharum* spp.) présente un intérêt économique très important : le sucre de canne occupe les 2/3 du marché mondial et la culture de la canne à sucre est de loin la première culture du monde (en terme de tonnage), ainsi que la septième principale culture de base servant à l'alimentation humaine (5). De l'état sanitaire des plantations dépendent la qualité et le rendement.

La mosaïque est une des principales maladies de la canne à sucre. Les premiers cas furent observés à Java en 1892, puis sur l'ensemble des zones de production sucrière exceptés le Guyana et l'île Maurice (16). En 2000, la maladie a été recensée dans soixante-dix-neuf pays (9).

Les symptômes caractéristiques de la maladie sont des aires chlorotiques vert pâle ou jaunâtres, plus facilement observables à la base des jeunes feuilles. Les symptômes foliaires peuvent apparaître dès les dix premiers jours après l'infection et se distribuent en des raies dispersées ou en de larges plages à la surface de la feuille, laissant des îlots d'un vert normal (figure 1). Ces chloroses sont généralement diffuses et peuvent, chez certains cultivars en réponse à certaines souches virales, manifester des décolorations nettement délimitées pouvant s'accompagner de nécroses ou de rougissements foliaires. Une décoloration rougeâtre de la nervure centrale est parfois aussi observée dans certaines associations cultivar de canne à sucre-souche virale. Les symptômes tendent à s'atténuer sur les feuilles âgées. L'intensité des symptômes peut varier en fonction du cultivar, des conditions de croissance et de la souche virale impliquée (9). Les cellules hôtes atteintes de mosaïque présentent des inclusions caractéristiques : les pinwheels (particules en forme de roue à aube) (26). Les chloroses en mosaïque proviennent d'une variation de la concentration en chlorophylle du limbe foliaire. Les chloroplastes y sont plus petits et peu nombreux et les cellules n'y sont pas différenciées (16).

Le *Sugarcane mosaic virus* (SCMV) et le *Sorghum mosaic virus* (SrMV) sont les deux agents pathogènes responsables de la mosaïque de la canne à sucre (9). Ces deux espèces virales du genre *Potyvirus* et de la famille *Potyviridae* se caractérisent par des particules filamenteuses et flexueuses, à symétrie hélicoïdale, d'environ 750 nm de long et 13 nm de large (28). Les particules constituées de 2000 sous-unités d'une protéine de capsid de 30 à 37 KDa contiennent un simple brin d'ARN positif d'environ 10 Kb. Ce dernier est traduit en une polyprotéine clivée autocatalytiquement en dix protéines (13,14). L'organisation du génome est caractéristique des *Potyvirus* (figure 2) et la protéine de capsid est une partie très conservée de leur génome : sa composition aminoacide est caractéristique du groupe (6). Elle a souvent été utilisée pour les études de diversité génétique chez les *Potyvirus* (26,25). On note 38-71% d'homologie entre les compositions amino-acide de la protéine de capsid des *Potyvirus* et 90-99% d'homologie entre les compositions des souches d'un même *Potyvirus* (24,25), mais les valeurs intra-espèces peuvent être plus faibles pour certains potyvirus (4). La protéine de capsid interviendrait dans la transmission du virus par vecteur, le mouvement de cellule à cellule et le mouvement sur longue distance dans la plante (2).

Le statut taxonomique du SCMV a récemment été revu (24,25,27). Suite à l'étude des propriétés sérologiques et de la séquence de la protéine de capsid plusieurs souches ont été reconnues : A, B, D, E, SC, Sabi, ISIS, Brisbane au sein du SCMV et H, I, M au sein du SrMV (25). Elles sont transmises de plante à plante par des aphides selon le mode non-persistant, mais également mécaniquement par inoculation artificielle. La mosaïque est également propagée rapidement de champ à champ par la plantation de boutures infectées (16).

La gravité des dommages que peut engendrer la maladie dépend de la souche virale, du stade physiologique de la plante hôte au moment de l'infection, de l'environnement et de la variété. L'Argentine, le Brésil et la Louisiane connurent dans les années 1920 de grandes épidémies responsables de l'effondrement de leur industrie sucrière (16).

Les moyens de lutte actuels sont purement préventifs et reposent sur un contrôle sanitaire ainsi que sur la création et l'utilisation de variétés résistantes. La sélection de variétés résistantes a permis de cultiver des variétés présentant de très bonnes qualités agronomiques et une résistance à la mosaïque. Que ce soit dans le cadre du contrôle sanitaire ou de la recherche de variétés résistantes à la mosaïque, deux méthodes de diagnostic sont utilisées en routine pour détecter la présence de virus dans les plantes : un contrôle visuel des symptômes et des tests sérologiques

(ELISA, immunoempreintes). Ces derniers permettent de différencier le SCMV et le SrMV, mais pas les différentes souches existant au sein de chaque espèce (9). Malgré la plantation de variétés résistantes et l'utilisation de matériel végétal sain issu de stations de quarantaine, les souches très variables de SCMV et de SrMV constituent toujours une menace potentielle pour l'industrie cannière. L'agent pathogène peut entraîner des pertes économiques importantes et sa variabilité peut retarder les programmes de renouvellement variétal. Il est donc indispensable de connaître cette variabilité et de disposer, en permanence, d'outils de détection adaptés afin de pouvoir détecter toutes les souches virales en quarantaine et d'introduire sans risque de nouvelles variétés sur le terrain. Une lutte efficace contre la mosaïque passe donc par l'approfondissement des connaissances scientifiques de la structure et la taxonomie des populations virales impliquées dans la maladie. Les techniques biochimiques et sérologiques utilisées jusqu'à aujourd'hui ne permettent pas de différencier les souches de SCMV et de SrMV (9). Le développement récent des techniques de biologie moléculaire fournit des bases solides pour l'identification des virus, leur classification, et l'étude de leur variabilité. De plus, ces techniques contribuent à la compréhension des mécanismes impliqués dans l'évolution de ces virus.

Récemment, Yang et Mirkov (31) ont proposé une méthode moléculaire (RT-PCR/RFLP) pour identifier rapidement les différentes souches de SCMV et de SrMV grâce à deux couples d'amorces spécifiques d'une région codant la protéine de capsid : SCMV F3-SCMV R3 et SrMV F3-SrMV R3. Cette méthode, appliquée en 2000 au CIRAD à Montpellier à une collection de virus responsables de symptômes de mosaïque sur canne à sucre, a permis de différencier le SCMV du SrMV. L'identification des souches virales par RFLP a cependant posé des problèmes, notamment de reproductibilité des profils types. En conséquence, l'étape RFLP a été abandonnée au profit du clonage puis du séquençage des produits amplifiés par RT-PCR.

Les couples d'amorces appliqués à cinquante-cinq isolats viraux d'Afrique, dont 29 du Cameroun et 21 du Congo, ont permis de confirmer leur appartenance au SCMV (1). En revanche, elles n'ont pas permis l'amplification d'isolats viraux originaires du Vietnam (Rott, comm. orale). Les fragments amplifiés des isolats viraux d'Afrique ont été clonés et séquencés. Les séquences ont été comparées aux séquences de souches de référence. Elles ne correspondent à aucune des souches de SCMV décrites auparavant, ce qui suggère qu'il existe en Afrique des souches nouvelles de SCMV différenciées géographiquement. En effet, les 29 isolats du Cameroun forment un groupe relativement homogène. En revanche, les isolats du Congo forment deux autres groupes à l'intérieur desquels les isolats se répartissent en deux sous-groupes distincts (1) (figure 3). D'autres études réalisées en serre de pathologie au CIRAD à Montpellier, ainsi que des observations sur le terrain en Afrique, sont en faveur d'une différence de pouvoir pathogène entre les isolats du Cameroun et ceux du Congo. Ainsi, une souche du SCMV originaire du Cameroun était pathogène sur la variété de canne à sucre B8008, mais pas sur la variété R570 ; en revanche, une souche du SCMV originaire du Congo était pathogène sur cette dernière. La variété R570 présente par ailleurs des symptômes sévères de mosaïque au champ au Congo, alors qu'aucun symptôme de mosaïque n'a été signalé pour cette variété au Cameroun en collection variétale (Rott, comm. orale).

Les isolats viraux originaires du Vietnam, testés en sérologie, n'ont pas réagi ou ont réagi très faiblement avec un sérum anti-SCMV préparé avec un isolat viral du Cameroun. De plus, ils n'ont pas infecté le maïs, habituellement très réceptif à la mosaïque de la canne à sucre. En revanche, ils ont présenté en microscopie électronique des filaments de type *Potyvirus* et leur pouvoir pathogène sur canne à sucre a été vérifié. L'hypothèse de la présence au Vietnam d'une nouvelle forme virale responsable de symptômes de mosaïque a été envisagée. En effet, un nouveau *Potyvirus* appartenant au genre *Rymovirus*, le *Sugarcane streak mosaic virus*, a récemment été décrit en quarantaine aux Etats-Unis comme responsable de symptômes de mosaïque sur canne à sucre importée du Pakistan (10).

Les objectifs de notre étude étaient de poursuivre les travaux entrepris au CIRAD à Montpellier sur la caractérisation d'une collection internationale d'isolats viraux responsables de la mosaïque de la canne à sucre. Dans un premier temps, nous avons étudié la variabilité du pouvoir pathogène de six isolats du SCMV originaire du Congo et du Cameroun. Ces six isolats viraux représentent la diversité génétique du SCMV dans ces deux pays (1). Dans un deuxième temps, nous avons essayé d'identifier et de caractériser une collection d'isolats viraux originaires d'Asie

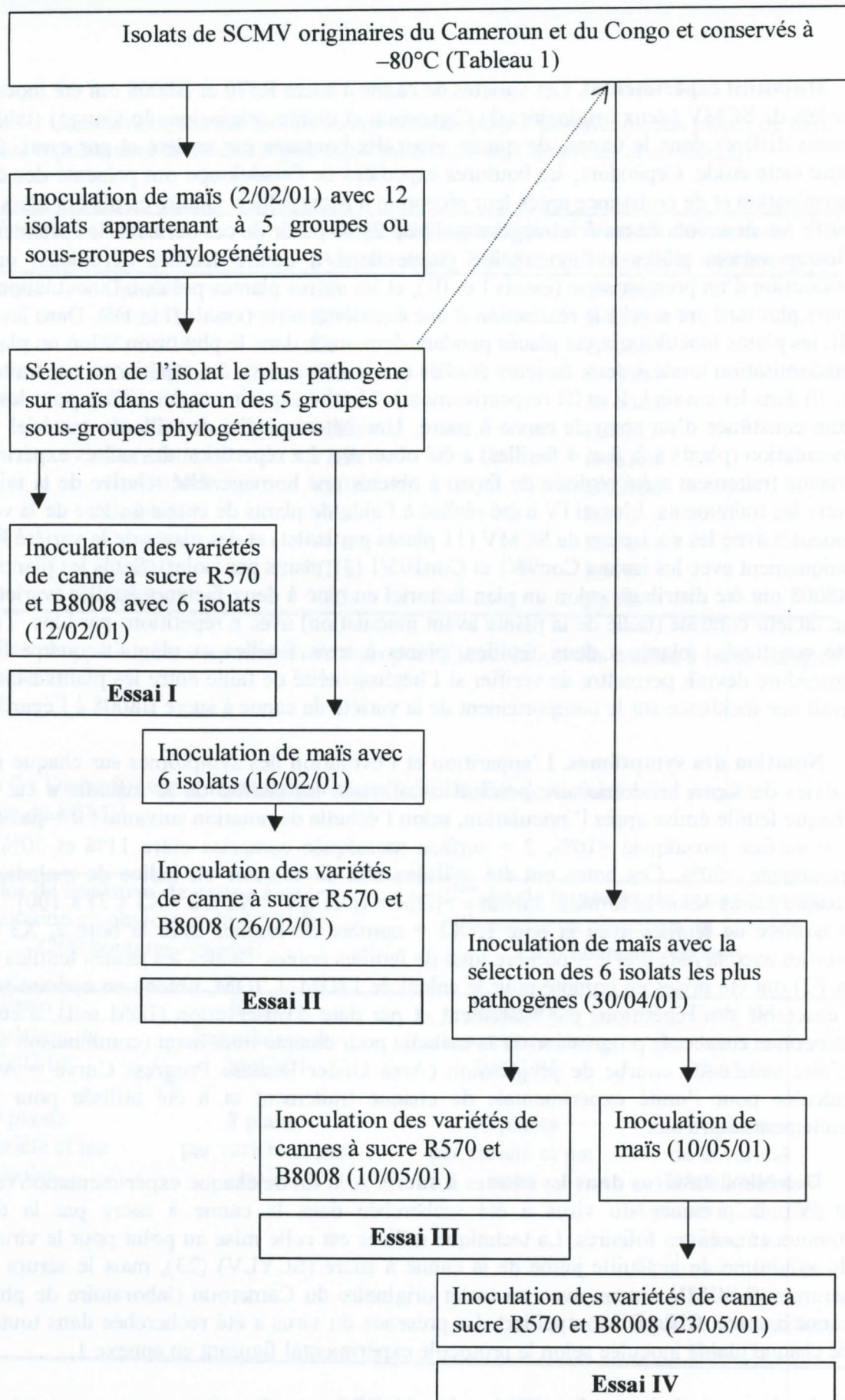


Figure 4 : Procédures expérimentales des essais I, II, III et IV mis en place pour l'étude de la variabilité du pouvoir pathogène des isolats de SCMV originaire du Cameroun et du Congo.

Résultats

Deux isolats ont été sélectionnés dans chacun des groupes ou sous-groupes phylogénétiques du SCMV comprenant des souches du Cameroun et du Congo (tableau 1) (1). Les douze isolats viraux ont été propagés sur maïs et un isolat de chaque groupe ou sous-groupe ayant produit les plus beaux symptômes a été retenu pour inoculer les cannes à sucre. Après leur sortie du congélateur, les six isolats ont été multipliés une (essais I et III) ou deux fois (essais II et IV) sur maïs pour produire l'inoculum nécessaire à l'infection de la canne à sucre (figure 4). Les isolats Cam1/1 et Con9/1, pour lesquels les hypothèses de variabilité du pouvoir pathogène avaient été formulées, n'ont pas été retenus et ont été remplacés par Cam1/2 et Con9/6. Ces derniers sont des isolats prélevés sur plante malade en serre à partir de maïs ou de canne à sucre inoculées respectivement avec les isolats Cam1/1 et Con9/1 prélevés au champ. Ils ont cependant un pourcentage de similarité de la séquence acide aminée de la protéine de capside élevé (99,8 et 99,9 %) respectivement avec les isolats Cam1/1 et Con9/1. Par ailleurs, Cam1/2 et Con9/6. Quatre essais de pouvoir pathogène du SCMV, différés dans le temps, ont été réalisés en inoculant deux variétés de cannes à sucre avec six isolats de SCMV.

Symptomatologie. Les premiers symptômes de mosaïque sont apparus sur la variété de canne à sucre B8008 sept jours après inoculation avec les isolats Con98/1 et Cam6/1 dans l'essai I, Cam6/1 et Con105/1 dans l'essai III et Cam6/1 dans l'essai IV. Les premiers symptômes sur la variété de canne à sucre R570 étaient visibles quinze jours après inoculation avec les isolats Con98/1 dans l'essai I, Con98/1 et Con9/6 dans l'essai II et l'ensemble des isolats de SCMV dans l'essai III. Ils sont apparus sur les plus jeunes feuilles déroulées (F0, F1) et aucun symptôme n'a été observé sur la feuille inoculée (F2). Ces symptômes, situés au départ à la base du limbe (zone de croissance des feuilles de Monocotylédones), ont ensuite évolué pour se répartir largement sur l'ensemble du limbe et prendre un aspect caractéristique de mosaïque. L'expression des symptômes était généralement similaire chez les deux variétés étudiées (B8008 et R570) quel que soit l'isolat viral. Cependant, le type de symptôme était parfois différent selon l'isolat. Certains isolats ont provoqué de petites raies vert clair, allongées dans le sens de la nervure, sur un fond vert foncé (Cam1/2) ; ces raies ont parfois évolué en formant de larges bandes décolorées (Con105/1 et Con9/6) ou un limbe plus clair que celui d'une feuille normale, avec des îlots vert sombre (Con98/1). Ces symptômes étaient parfois accompagnés de nécroses rouges (Con11/1, Cam6/1 et Con98/1) (figure 5). Ils avaient tendance à s'atténuer sur les feuilles les plus âgées, ce qui a rendu l'évaluation de la gravité de la maladie plus difficile. Des mosaïques ont aussi été observées sur la nervure centrale de la feuille, mais pas de symptômes évidents de nanisme.

Variabilité du pouvoir pathogène de six isolats du SCMV. Huit semaines après inoculation des plants de canne à sucre, la gravité de la maladie (évaluée sur les trois feuilles F0, F1, F2) était très variable selon l'isolat de SCMV, la variété de canne à sucre et l'essai considéré. Trois types de progression de la maladie ont pu être définis. Ceux-ci correspondent à trois niveaux de pouvoir pathogène des six isolats viraux sur les variétés B8008 ou R570 (figures 6 et 7) :

- des isolats de SCMV «très pathogènes» qui provoquent l'apparition de symptômes visibles au cours de la semaine suivant l'inoculation ; la progression de la maladie est ensuite très rapide et l'IDM atteint des valeurs maximales de 80 à 100, sept à huit semaines après inoculation ;
- des isolats «moyennement pathogènes» pour lesquelles les symptômes de mosaïque apparaissent généralement entre 7 et 14 jours après inoculation ; la cinétique de progression de la maladie est alors plus lente que pour les isolats «très pathogènes» et les valeurs d'IDM sont comprises entre 20 et 80 à l'issue des huit semaines d'expérimentation ;
- des isolats «non ou peu pathogènes» qui ne provoquent pas de symptômes ou des symptômes dont l'apparition est tardive (3 à 6 semaines selon l'essai) ; les valeurs d'IDM n'excèdent pas 10, huit semaines après inoculation.

Par ailleurs, les isolats ont pu être classés du plus pathogène au moins pathogène sur les variétés B8008 et R570 pour les quatre essais, après transformation en rang grâce et une comparaison



a



b



c

Figure 5 : Différents types de symptômes de mosaïque sur canne à sucre provoqués par deux isolats du SCMV : (a) isolat Con11/1 sur la variété R570 ; (b) et (c) isolat Con98/1 sur la variété B8008

quantitative des AUDPC (comparaison deux à deux de Tukey). Un effet isolat a été trouvé sur les deux variétés et sur les quatre essais ($P=0,000$).

Classement des isolats de SCMV sur la variété B8008 (figure 6). Con98/1 est l'isolat viral le plus pathogène et Cam1/2 le moins pathogène des six isolats. Ces isolats appartiennent respectivement aux isolats définis précédemment comme étant «très pathogènes» et «non ou peu pathogènes». Ce classement est vérifié dans les essais I, II, III mais pas dans l'essai IV où l'isolat Cam1/2 se situe parmi les isolats moyennement pathogènes. Les autres isolats présentent une pathogénie intermédiaire et leur classement respectif varie en fonction de l'essai. On notera cependant que les isolats Con105/1 et Cam6/1 se sont révélés aussi pathogènes que l'isolat Con98/1 dans les essais II et IV, respectivement.

Classement des isolats de SCMV sur la variété R570 (figure 7). Un classement des six isolats viraux selon leur pouvoir pathogène sur la variété R570 dans les essais I et II a confirmé le résultat des courbes de progression : à l'exception de l'essai III, au cours duquel l'ensemble des six isolats a provoqué des symptômes, seuls les isolats Con98/1 (dans les essais I et II) et Con9/6 (dans l'essai II) ont conduit à l'expression de symptômes. L'isolat Con105/1, non pathogène dans les essais I et II, a eu un comportement d'isolat moyennement pathogène dans les essais III et IV. Dans les quatre essais l'isolat Con98/1 était le plus pathogène sur la variété R570. Cependant, l'aspect quantitatif du pouvoir pathogène de cet isolat a varié sur l'ensemble des quatre essais : isolat moyennement pathogène dans l'essai I et très pathogène dans les essais II, III et IV. Le traitement des AUDPC en analyse de variance avec un facteur étudié (isolat) et un facteur contrôlé (taille) n'a pas mis en évidence d'effet taille à $P=0,171$ sur le pouvoir pathogène des isolats.

Détection du virus dans la plante : relation symptôme/infection. A la fin de chaque essai, la présence du SCMV a été recherchée par immunoempreintes dans toutes les feuilles émises après la feuille inoculée. 209 plants de canne à sucre et 614 feuilles des variétés R570 et B8008 qui ont présenté des symptômes de mosaïque étaient aussi infectés par le virus, quel que soit l'inoculum viral. Le test sérologique était négatif pour 90 plantes dont toutes les feuilles étaient sans symptôme huit semaines après inoculation. En revanche, le SCMV a été détecté dans des feuilles sans symptôme de plantes infectées. Ces feuilles étaient surtout des feuilles âgées localisées à la base des plantes (feuilles de rang F4 à F7).

Discussion

Variabilité du pouvoir pathogène du SCMV sur B8008. La variété B8008 est plus sensible à la mosaïque que la variété R570 car elle a présenté des symptômes de maladie quels que soient les isolats de SCMV. Ces derniers ont cependant un pouvoir pathogène variable sur cette variété au vu des gravités de maladie très diverses observées dans chaque essai. L'aspect quantitatif de la réponse de B8008 aux isolats de SCMV pourrait correspondre à ce que Van der Planck (1968) (30) a défini comme une résistance horizontale (ou générale) et les différents niveaux du pouvoir pathogène des isolats pourraient correspondre à des différences d'agressivité. Ainsi, pour un même nombre initial de particules virales, certains isolats seraient plus aptes à se multiplier rapidement et à provoquer plus de symptômes que d'autres : on dit que ces isolats sont plus agressifs que d'autres. Cela suppose néanmoins que l'inoculum de départ soit homogène. L'importance quantitative de l'inoculum peut être mise en relation avec notre procédure expérimentale d'inoculation des plants de canne à sucre. Malgré une homogénéité apparente de l'inoculum (1 g de jeunes feuilles de maïs présentant des symptômes avec les notes les plus sévères), celui-ci a néanmoins pu être variable en fonction des différents isolats viraux. Ainsi, la variabilité du pouvoir pathogène d'un isolat, observée d'un essai à un autre, pourrait être due à un effet plante ou à un facteur extérieur mais aussi une variation du nombre de particules présentes dans l'inoculum utilisé pour infecter la canne à sucre.

Variabilité du pouvoir pathogène des isolats sur R570. La réaction de la variété R570 aux isolats de SCMV est plus difficile à interpréter car elle était nettement différente entre les deux

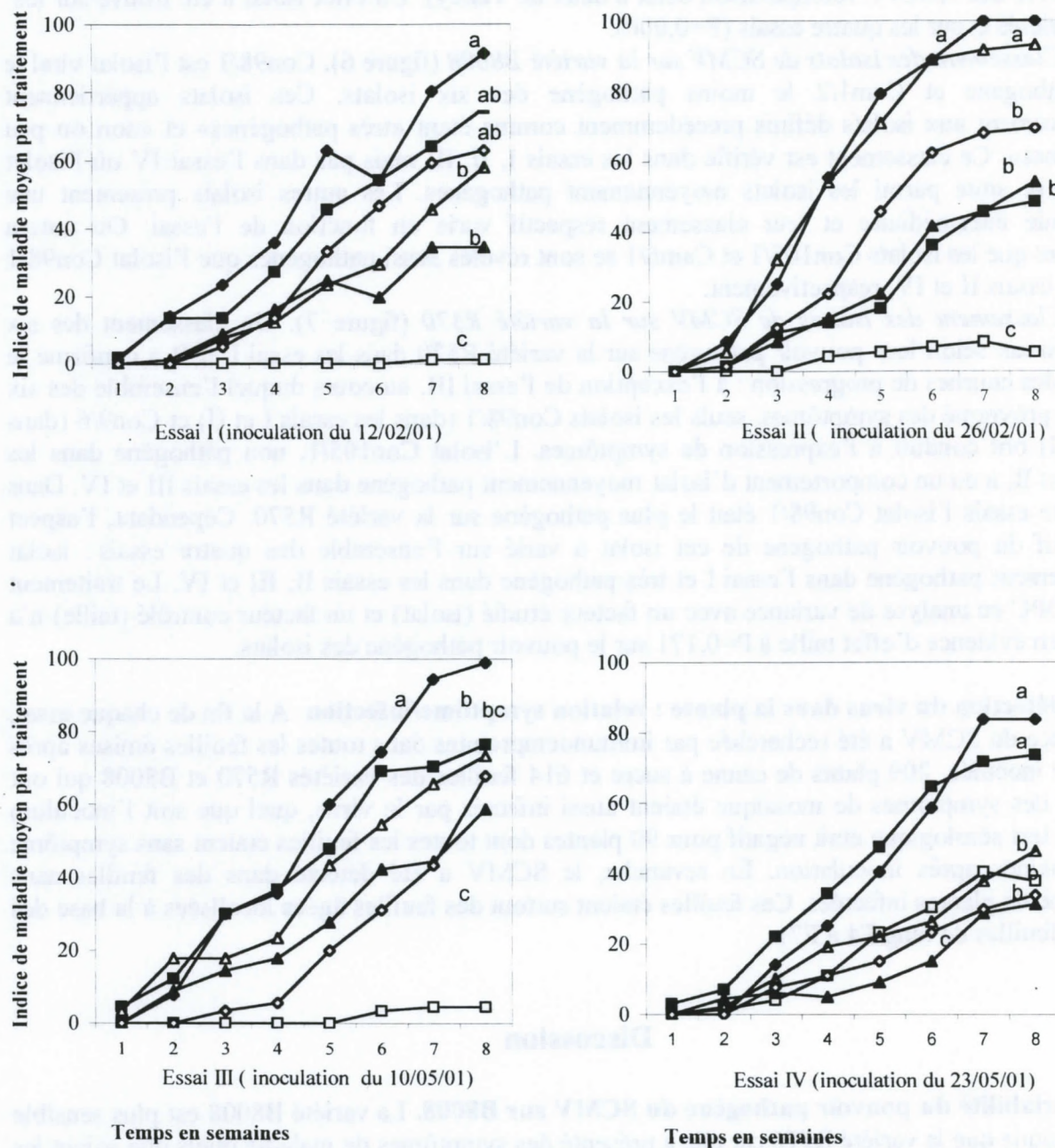


Figure 6 : Progression de la maladie chez la variété de canne à sucre B8008 inoculée avec six isolats de SCMV. Les AUDPC des courbes surmontées de la même lettre ne sont pas différents à $P = 0,05$ selon l'analyse de la variance. L'analyse de variance était significative à $P = 0,001$.

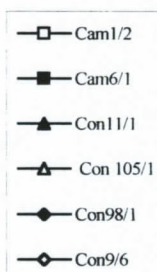
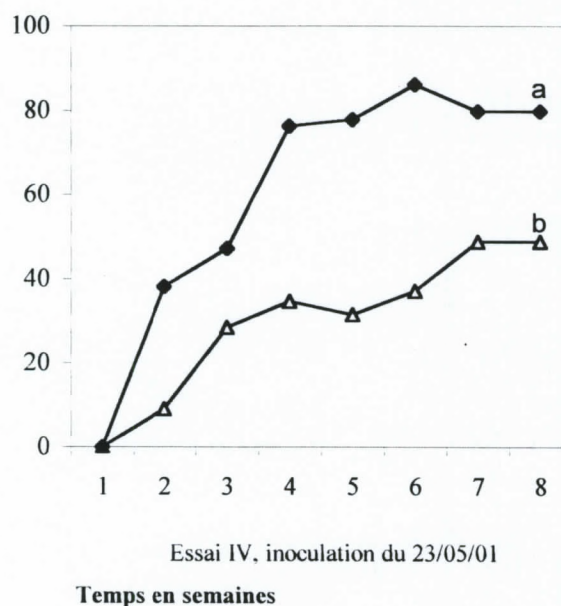
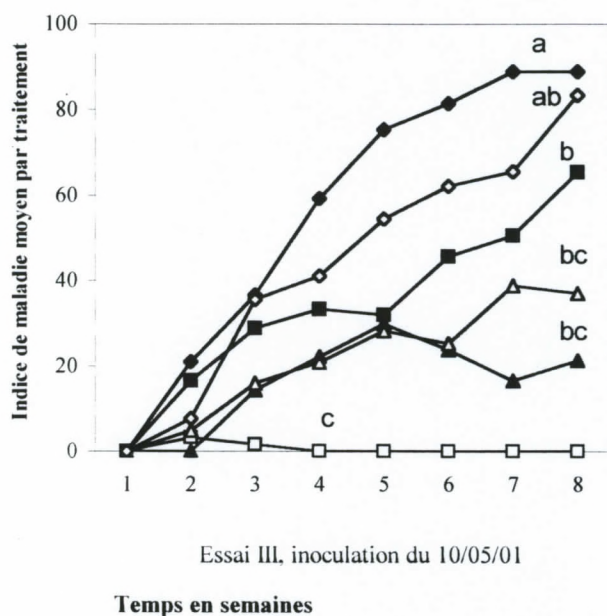
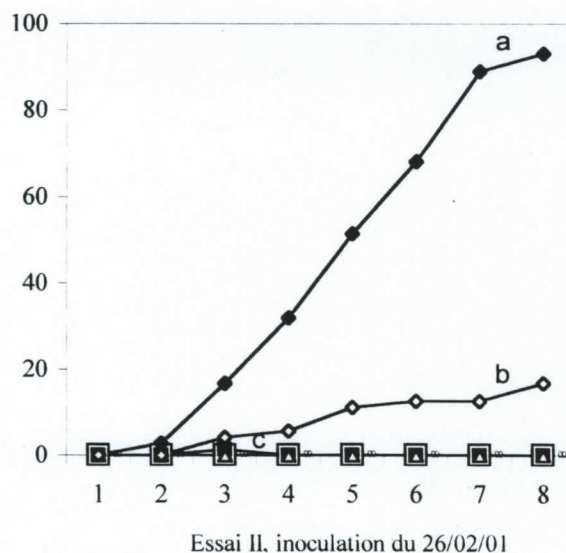
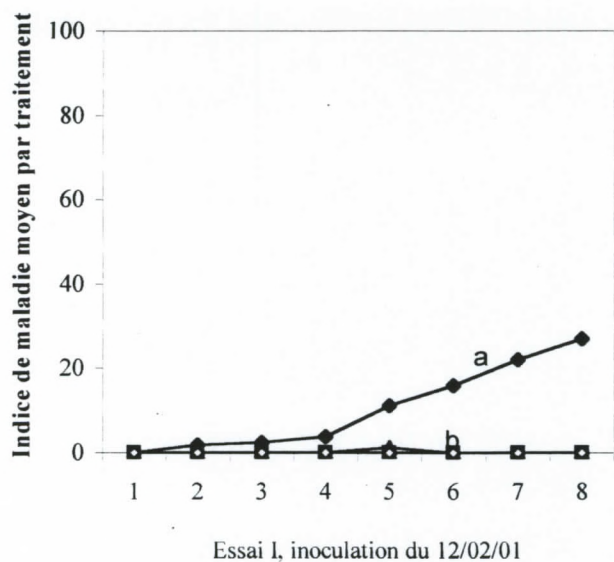


Figure 7 : Progression de la maladie chez la variété de canne à sucre R570 avec six isolats de SCMV (sauf deux pour l'essai IV). Les AUDPC des courbes surmontées de la même lettre ne sont pas différentes à $P = 0,05$ selon l'analyse de variance. L'analyse de la variance était significative pour l'effet isolat ($P = 0,001$) dans les 4 essais.

premiers essais et le troisième. Le comportement de R570 dans les essais I et II était en accord avec l'hypothèse formulée au départ, à savoir la sensibilité de cette variété à l'égard du SCMV du Congo et sa résistance à l'égard du SCMV du Cameroun. Ainsi, les souches Con11/1, Con105/1, Cam1/2 et Cam1/6 n'ont jamais provoqué de symptômes, contrairement aux isolats Con98/1 et Con9/6. L'absence de symptômes après inoculation des isolats Con11/1 et Con105/1 pourrait paraître surprenante mais elle est plausible car ces isolats, quoique originaires du Congo, appartiennent à un groupe phylogénétique différent de celui des isolats Con98/1 et Con9/6. De plus, ils ont été isolés à partir de la variété B46364 sur laquelle ils ont provoqué des symptômes au champ alors que les isolats Con98/1 et Con9/6 ont été isolés à partir de la variété R570 (figure 3). La réponse de type tout ou rien observée sur R570 pourrait correspondre à ce que Van der Planck (1968) (30) a défini comme une résistance verticale (ou spécifique). On notera cependant que le pouvoir pathogène de l'isolat Con98/1 sur R570 varie, huit semaines après inoculation, de moyennement pathogène dans l'essai I (IDM= 30) à très pathogène (IDM= 93) dans l'essai II, (figure 7). L'isolat Con9/6 était non pathogène sur R570 dans l'essai I et faiblement pathogène dans l'essai II.

Comme pour la variété B8008, on ne peut exclure un effet de l'inoculum pour expliquer le comportement variable des isolats sur la variété R570. On notera cependant que le même inoculum de Con9/6, apparemment non ou peu infectieux sur R570, a conduit à des IDM supérieurs à 60 sur la variété B8008 (essais I et II). L'inoculation de virus à des plantes (à la différence de l'inoculation de bactéries et de champignons) est une étape délicate car la charge virale est difficilement contrôlable. Le passage du matériel viral sur plante hôte intermédiaire (réalisé sur maïs dans cette expérience) permet généralement d'augmenter et d'homogénéiser la charge infectieuse. L'augmentation de l'agressivité de l'isolat Con98/1 entre l'essai I et l'essai II pourrait en être une illustration. En effet, l'inoculum utilisé pour infecter la canne à sucre était issu d'un seul passage sur maïs dans l'essai I, alors qu'il était issu de deux passages sur maïs dans l'essai II (figure 4). On peut donc aussi formuler l'hypothèse que deux passages sur maïs ont permis d'amener la charge virale de Con9/6 à un seuil de pouvoir infectieux minimum nécessaire à l'expression de la maladie sur R570, seuil qui n'était pas atteint après un seul passage sur maïs (essai I).

L'expression de symptômes de mosaïque par la variété R570 inoculée avec Con11/1 et Con105/1, mais surtout avec Cam1/2 et Cam6/1, était très surprenante et inattendue dans l'essai III (figure 7). Ce résultat pourrait aussi être attribué à une charge virale initiale très importante, même si cela paraît peu probable. En effet, la variété R570 a été inoculée dans l'essai III (comme dans l'essai I), avec un inoculum qui a eu un seul passage sur maïs. Or, dans l'essai I, seul Con98/1 était pathogène alors que dans l'essai III tous les isolats s'avèrent être pathogènes à différents niveaux. La pathogénie des isolats Con11/1, Con105/1 et Cam6/1 pourrait en fait être reliée à deux facteurs. En effet, les boutures de canne à sucre utilisées pour les essais III et IV ont été récoltées en Guadeloupe, à une époque où l'île était atteinte d'une sécheresse importante. Elles ont présenté une difficulté à la germination à leur arrivée à Montpellier, notamment la variété R570. Ce retard de croissance pourrait correspondre à l'expression d'un stress ayant provoqué une altération des réactions de défense de la plante ce qui serait devenue plus sensible à la mosaïque. Par ailleurs, deux accidents thermiques sont survenus au sein de phytotron dans lequel étaient disposées nos plantes au cours de l'essai III. Ainsi, une élévation excessive et anormale de la température (plus de 30°C pendant plusieurs heures) a été relevée sur le thermographe placé en permanence dans l'enceinte climatique. Le potentiel d'infection pouvant varier de façon conséquente selon les modalités de culture, ce choc climatique pourrait indirectement être responsable de l'expression ultérieure de la mosaïque en favorisant l'expression du pouvoir pathogène du SCMV, ou en affaiblissant les réactions de défense de la plante. L'hypothèse d'un effet thermique favorable à l'expression des symptômes est confortée par des résultats semblables obtenus avec des isolats asiatiques responsables de symptômes de mosaïque sur deux autres variétés de canne à sucre (FR96029 et FR96047) (cf deuxième partie). L'effet de la température sur la multiplication virale a déjà été rapporté. Lebeurier (1966) (18) ainsi que Franck et Hirth (1972) (7), en étudiant la multiplication du virus de la mosaïque du tabac (VMT) et du virus de la mosaïque de la luzerne en fonction de la température, ont isolé une souche thermophile VMT_{TC} qui se multiplie à 36°C mais pas à 28°C. La température joue souvent, chez les virus végétaux, un rôle important sur le temps

d'apparition des symptômes. Dans une gamme de températures permettant la croissance normale de l'hôte, les symptômes apparaissent d'autant plus rapidement que la température est plus élevée (15). Des différences d'apparition des symptômes dans le temps ont été observées chez le maïs Dixie22 infecté par une suspension de virus purifié de la souche SCMV-Ampefy originaire de Madagascar. Les symptômes apparaissent au bout de 14 jours de croissance à 15°C et dès 3 jours à 32°C (3). L'influence de la température sur l'expression de la maladie est cependant complexe car elle intervient, non seulement sur la multiplication virale, mais également sur la diffusion du virus dans l'hôte, sur le métabolisme de la plante et sur les interactions entre ces facteurs. La souche SCMV-Ampefy a, par ailleurs, le comportement d'une souche psychrophile : la multiplication virale est plus rapide aux températures supérieures à 25°C, mais les conditions de multiplication optimales (teneur en antigène viral maximum et pouvoir infectieux stable) se situent à des températures plus basses (16-20°) pour lesquelles les symptômes sont plus nets qu'aux températures plus élevées. Cette souche est adaptée aux conditions optimales de croissance de son hôte (20-32°C) et de son environnement (amplitude journalière 15-32°C). En revanche, une souche de MDMV-A infectant le maïs, a induit la formation de symptômes de mosaïque de plus en plus nets avec l'élévation de la température entre 15 et 26,5°C (29). A cette température, la multiplication du MDMV-A correspond au niveau de croissance optimal du maïs. Ce comportement pourrait être mis en relation avec les résultats obtenus sur la variété R570 inoculée avec les souches africaines de SCMV. Le SCMV étant un virus de plante tropicale, une élévation de la température pourrait permettre, comme pour le MDMV-A, une meilleure expression des symptômes. Des températures voisines de 30°C pourraient correspondre à des températures favorables simultanément à la croissance de la plante et à la multiplication du virus *in planta*. Par ailleurs, l'alternance de températures faibles et élevées pourrait également être responsable du développement de symptômes sur la variété R570 inoculée avec Cam6/1, Con11/1, Con105/1. Des isolats pourraient se propager dans des hôtes soumis à des amplitudes journalières de température importantes grâce à une phase de multiplication intense à des températures supérieures à 30°C et une phase de stabilité à des températures plus basses.

Interaction variété de canne à sucre/isolat viral. Les résultats d'expériences antérieures en faveur d'interactions variété/isolat viral ont été confirmés au cours de notre étude dans les essais I et II. La simple analyse des courbes de progression de la maladie dans ces essais a suffi à mettre en évidence cette interaction. En revanche, cette interaction n'est pas mise en évidence dans l'essai III, après comparaison des AUDPC des plants de B8008 et de R570 par une analyse de variance. De façon générale, la variété B8008 est plus sensible au SCMV que la variété R570. Cependant, la variété B8008 exprime un niveau de résistance variable à l'égard des isolats de SCMV originaires du Cameroun : elle est sensible à l'isolat Cam6/1 et résistante à l'isolat Cam1/2 (sauf dans l'essai IV). Par ailleurs, elle est sensible à tous les isolats viraux du Congo. La variété R570 est sensible aux isolats de SCMV originaires du Congo et résistante à ceux du Cameroun (sauf dans l'essai III). La résistance de la variété R570 au SCMV du Cameroun pourrait cependant s'effondrer, soit en raison d'une charge virale très forte (supérieure à celle nécessaire pour provoquer des symptômes sur B8008), soit par suite d'une modification des conditions de culture (élévation de la température) lors de la multiplication du virus dans la plante.

Relation entre la diversité génétique et la variabilité du pouvoir pathogène. Aucune relation entre le pouvoir pathogène des six isolats de SCMV et leur appartenance à un groupe phylogénétique n'a pu être mise en évidence (tableau 3) : des isolats d'un même groupe présentent en effet un pouvoir pathogène différent vis-à-vis d'une même variété. Con98/1 et Con9/6 ont 99,9% et 98,0% de similarité, respectivement pour la séquence nucléotidique et la composition en acides aminés de la protéine de capsid (Alegria, *comm. pers.*). En revanche, ils appartiennent respectivement à la classe des souches dites «très pathogènes» et à la classe des souches dites «moyennement pathogènes». De même, alors que la séquence nucléotidique de la protéine de capsid des isolats Cam1/2 et Cam6/1 présente un pourcentage de similarité élevé (98,8%), le pouvoir pathogène très faible voire la non pathogénie de Cam1/2 la distingue nettement de l'isolat Cam6/1. La diversité génétique du SCMV nouvellement observée au Cameroun et au Congo

Tableau 3 : Relation entre la diversité génétique de six isolats de SCMV et leur pouvoir pathogène sur les variétés de cannes à sucre B8008 et R570.

Pays d'origine	Souche	Variété de canne à sucre hôte au champ	Groupe phylogénétique	Groupe de pathogénie*
Cameroun	Cam1/2	B46 364	IX	+
	Cam6/1	B46 364	IX	++
Congo	Con11/1	B46 364	VIIIa	++
	Con105/1	B46 364	VIIIb	++
	Con98/1	R570	VIIa	+++
	Con9/6	R570	VIIIb	++

- *
 + = souche peu ou pas pathogène sur les variétés B8008 et R570
 ++ = souche moyennement pathogène sur la variété B8008 ou R570
 +++ = souche très pathogène sur les variétés B8008 et R570



Figure 9 : Dispositif en randomisation totale des plants de canne à sucre FR96029, de maïs Golden Cross Bantam et de sorgho Tx412, en salle de culture

présente cependant une structuration géographique, voire une structuration basée sur la plante hôte. Les isolats du Cameroun isolés de variétés diverses forment un groupe relativement homogène et génétiquement distinct des isolats du Congo. Ces derniers constituent deux groupes dont un contient des isolats uniquement prélevés sur la variété R570 (Alegria *et al.*, 2001).

Distribution du virus dans la plante. La recherche du SCMV dans les deux variétés de canne à sucre, inoculées avec les six isolats viraux, a permis de vérifier que les symptômes correspondaient bien à une infection de la plante. En revanche, les symptômes ont tendance à s'atténuer voire à disparaître sur les feuilles les plus âgées bien que le virus soit toujours présent dans ces feuilles. Il ne semble pas y avoir de répartition préférentielle du virus dans la plante : le SCMV est toujours présent dans les jeunes feuilles émises après inoculation (F0, F1, F2) et l'infection persiste généralement aussi dans les feuilles les plus âgées (F4, F5, F6). La distribution des six isolats africains est donc de type systémique et généralisée dans les deux variétés de canne à sucre. La technique des immunoempreintes ne permet cependant pas de titrer la teneur en antigène viral en fonction du rang de la feuille et des variations quantitatives sont possibles. Un test sérologique de type ELISA permettrait de le vérifier (figure 8 en annexe V).

Caractérisation d'isolats viraux originaires d'Asie et responsables de mosaïque de la canne à sucre

Matériels et méthodes

Culture du matériel végétal en salle climatique. La variété de canne à sucre B46364, réputée sensible à la mosaïque en serre mais tolérante au champ, a été retenue pour les différents travaux de caractérisation des six isolats asiatiques. Elle a été utilisée comme hôte intermédiaire afin de multiplier ces isolats et de disposer d'échantillons foliaires frais présentant des symptômes de mosaïque pour les travaux de «leaf dip», d'extraction d'ARN total et d'inoculation de plants de maïs, de sorgho et de canne à sucre. Par ailleurs, ces trois espèces végétales ont été utilisées pour caractériser le pouvoir pathogène des six isolats viraux asiatiques : les variétés de canne à sucre FR96029 (essai I) et FR96047 (essai II), la variété de sorgho Tx412 et la variété de maïs Golden Cross Bantam. Toutes ces variétés sont réputées sensibles au SCMV originaire du Cameroun. La croissance de ces plantes a eu lieu dans une salle de culture à 28°C avec une photopériode de 12 heures ; elles ont été régulièrement alimentées avec une solution nutritive décrite plus haut (voir la première partie sur les isolats africains) (figure 9).

Matériel viral. Six isolats viraux originaires du Bangladesh, d'Inde, du Sri-Lanka, de Thaïlande, du Vietnam et du Pakistan ont été étudiés (tableau 4). Ils proviennent de la collection du laboratoire Phytrop du CIRAD qui a été constituée à partir de prospections au champ réalisées en 2000 et 2001. Un isolat de SCMV originaire du Cameroun (SCMV Cam6/1) et l'isolat SrMV 51/1 ont été utilisés comme témoins positifs. Tous ces isolats sont conservés à -80°C sous forme de feuilles avec symptômes.

Caractérisation du pouvoir pathogène.

Méthode d'inoculation. Des échantillons foliaires de canne à sucre malade ont été prélevés au congélateur puis broyés dans une solution tampon Sorensen (cf première partie). La suspension virale obtenue a été utilisée pour inoculer la variété de canne à sucre B46364 (2 g de feuille dans 8 ml de tampon pour 10 plants). La méthode d'inoculation opérée est identique à celle décrite à la première partie. Pour chaque isolat, les jeunes feuilles de canne à sucre (F0 et F1), présentant des symptômes à note 3, quinze jours après inoculation, ont servi à leur tour de source d'inoculum à des plants de canne à sucre, de maïs et de sorgho (2 g de feuille dans 8 ml de tampon pour 10 plants de canne à sucre ou 15 plants de maïs ou de sorgho). Des plantes uniquement inoculées avec la

Tableau 4 : Caractéristiques des 23 isolats viraux non identifiés et provoquant des symptômes de mosaïque sur la canne à sucre en Asie

<i>Pays d'origine</i>	<i>Isolat viral</i>	<i>Variété de canne à sucre hôte</i>	<i>Année de prélèvement</i>
Vietnam	Vnm13/1	SP79-2312	1998
"	Vnm14/1*	83V288	1998
"	Vnm14/6	B46364	2000
Sri-Lanka	Lka114/1	SL7103	2000
"	Lka115/1	SL7130	"
"	Lka116/1*	SL88116	"
Bangladesh	Bgd117/1	Isd 5-55	2001
"	Bgd119/1	CP52-68	"
"	Bgd123/1	CP29-291	"
"	Bgd127/1	Gandari B	"
"	Bgd131/1*	NCo 310	"
Inde	Ind156/1	Co740	2001
"	Ind157/1	Co1148	"
"	Ind159/1*	CoC671	"
"	Ind162/1	CoS510	"
"	Ind163/1	CoS94 270	"
Thaïlande	Tha140/1	?	2000
"	Tha149/1	?	"
"	Tha150/1	?	"
"	Tha151/1*	?	"
Pakistan	Pak153/1	BL-4	2001
"	Pak154/1	CP72-2086	"
"	Pak155/1*	CPF-236	"

*Isolats les plus pathogènes (par région géographique) sur la variété de canne à sucre B46364 ; ils ont été retenus pour l'inoculation des plants de canne à sucre (variétés FR96029 et FR96047), de maïs (variété Golden Cross Bantam) et de sorgho (variété Tx412)

solution tampon, ont servi de témoins négatifs. La méthode d'inoculation est identique à celle décrite à la première partie.

Dispositif expérimental. Deux essais (I et II) séparés dans le temps ont été réalisés. Dans chaque essai, quinze plants de canne à sucre, de maïs et de sorgho ont été inoculés par isolat. Les quarante-cinq plantes ont ensuite été disposées dans une salle de culture selon un plan factoriel en randomisation totale à un facteur étudié (isolat). L'unité expérimentale pour les observations était constituée d'un plant de canne à sucre, de maïs ou de sorgho.

Notation des symptômes. Dans chacun des essais, l'apparition et l'évolution des symptômes ont été suivies sur chaque plante de façon hebdomadaire pendant deux mois. Un IDM moyen par traitement et l'AUDPC de chaque plant (cf première partie) ont été utilisés pour caractériser respectivement la progression et la gravité de la maladie.

Analyses statistiques. Une analyse de variance des AUDPC (après transformation en rangs) a été réalisée à l'aide du logiciel Minitab 13.31 (20).

Caractéristiques morphologiques. Les caractéristiques morphologiques des isolats ont été étudiées en microscopie électronique à transmission par la méthode du «leaf dip». Cette technique fait appel à un simple contraste des particules virales après évaporation d'une solution aqueuse d'un sel de métal lourd (opaque aux électrons). Des préparations foliaires ont été réalisées par dilacération d'un morceau d'environ 1 cm² de feuille de canne à sucre de la variété B46364 présentant des symptômes, selon le protocole décrit en annexe II.

Caractéristiques immunologiques. Les propriétés immunologiques des isolats viraux ont été déterminées à l'aide de la technique d'immunoempreintes foliaires selon le protocole figurant en (annexe I). L'immunoempreinte est une technique sérologique de type ELISA qui fait appel à une membrane de nitrocellulose comme support de fixation des antigènes. La présence des antigènes est par la suite révélée à l'aide d'anticorps. Cette technique présente l'avantage d'être rapide et facile à mettre en œuvre. Les empreintes des feuilles de rang F1 ont été réalisées pour les variétés de canne à sucre FR96096 et FR96047. Trois antisérums différents ont été testés : un antisérum anti-SCMV préparé avec une souche originaire du Cameroun (laboratoire Phytrop, CIRAD, Montpellier) dilué au 1/10000, un antisérum anti-Potyvirus (AGDIA) dilué au 1/10000 et un antisérum anti-SCMV d'Inde (Dr. G.P. Rao, Sugarcane Research Station, Gorakhpur, Inde) dilué au 1/5000.

Caractéristiques moléculaires. Les ARNs viraux extraits à partir de la variété B46364 ont été soumis à une étape de transcription inverse (Reverse transcription ou RT) afin d'obtenir un ADN complémentaire (cDNA). Différents couples d'amorces spécifiques ont été testés afin d'amplifier la région codant la protéine de capsid. Les protocoles des techniques d'extraction d'ARN total et de RT-PCR figurent en annexe III.

Amorces spécifiques du SCMV. Les amorces SCMV F4 et SCMV R3 utilisées pour l'étude de la diversité du SCMV par Alegria (1) ont été utilisées. Ces amorces permettent d'amplifier un fragment d'environ 0,9Kb qui représente la quasi totalité de la protéine de capsid. Ces amorces spécifiques du SCMV ne permettent l'amplification des souches de SrMV.

Amorces spécifiques du genre Potyvirus. Les amorces oligo1n et oligo2n (19) s'hybrident avec des séquences de Potyvirus et permettent d'amplifier un fragment de 327 pb correspondant à une région de la protéine de capsid commune à toutes les souches de SCMV des Graminées. Cette région, comprise entre les motifs aminoacides MVWCIE et QMKAAA est localisée dans la région très conservée du centre de la protéine de capsid (19). Les amorces oligo1n et oligo2n correspondent aux amorces U335 et D335 mises au point par Langeveld *et al.*(17) mais elles sont moins dégénérées.

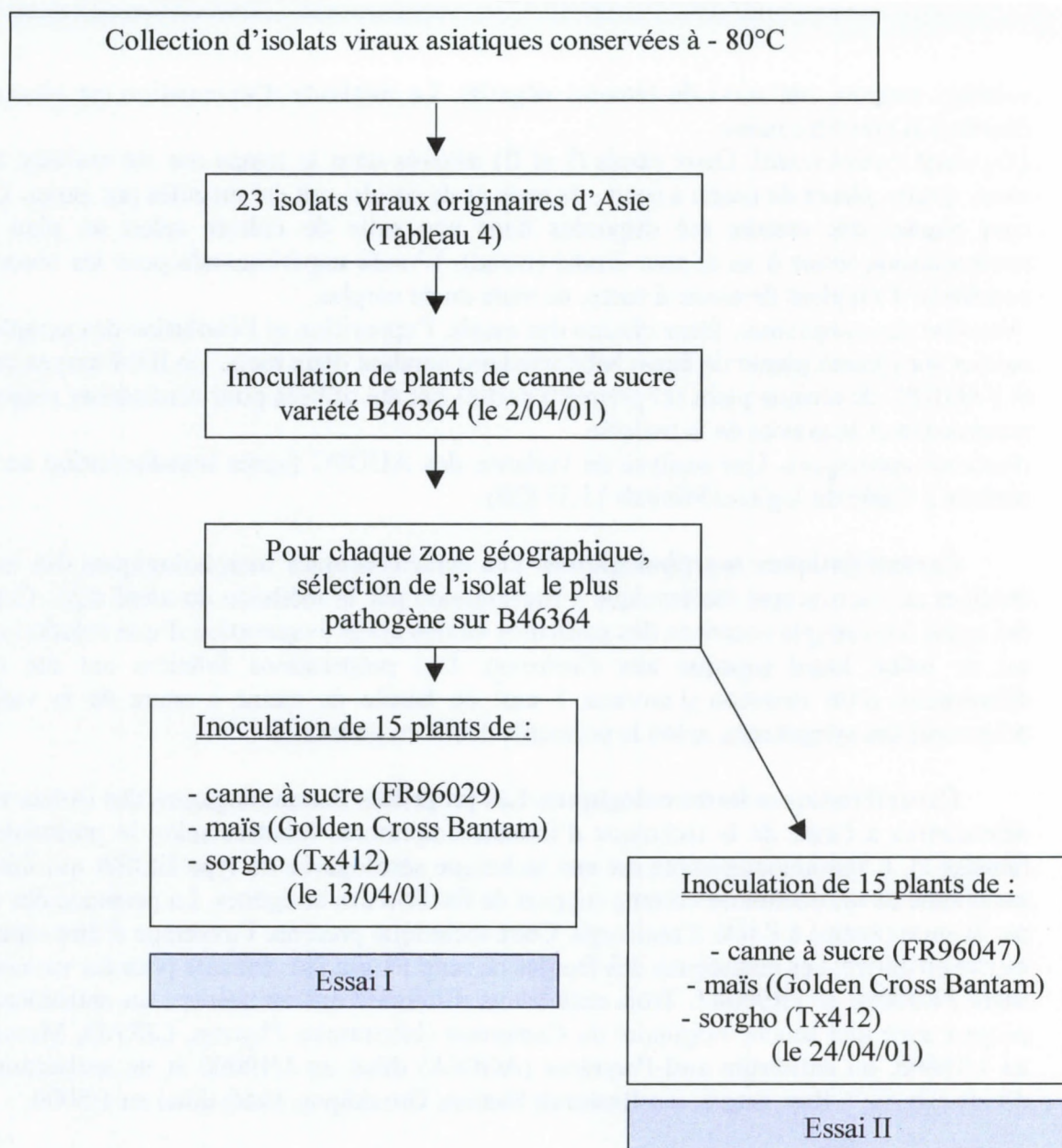


Figure 10 : Procédure expérimentale des essais mis en place pour l'étude du pouvoir pathogène d'isolats viraux provoquant des symptômes de mosaïque en Asie.



Figure 11 : Symptômes de mosaïque provoqués par un isolat originaire du Sri-Lanka.

Résultats

Vingt-trois isolats viraux provenant du Bangladesh, d'Inde, du Pakistan, du Sri-Lanka, de la Thaïlande et du Vietnam (soit trois à cinq isolats par pays), ont été sélectionnés à partir de la collection du laboratoire Phytrop du CIRAD à Montpellier (tableau 4). Ils ont, dans un premier temps, été inoculés à des plants de canne à sucre de la variété B46364 afin de multiplier le virus et de vérifier leur pouvoir infectieux. Six isolats ont été retenus sur la base des symptômes les plus sévères puis utilisés pour inoculer les deux variétés de canne à sucre (FR96029, FR96047), une variété de maïs (Golden Cross Bantam) et une variété de sorgho (Tx 412) (tableau 4 et figure 10). Des symptômes de mosaïque ont été provoqués par les six isolats asiatiques et les isolats témoins de SCMV (Cam6/1) et de SrMV (USA51/1) sur les trois espèces végétales.

Symptomatologie et variabilité du pouvoir pathogène sur canne à sucre. Des symptômes de mosaïque (figure 11) étaient visibles sur le feuillage dès la deuxième semaine après l'inoculation :

- de la variété FR96029 (essai I) avec l'isolat SCMV Cam6/1 du Cameroun et l'isolat Pak155/1 du Pakistan (figure 12),
- de la variété FR96047 (essai II) avec les isolats SCMV Cam6/1 et SrMV 51/1, ainsi que l'ensemble des six isolats viraux d'Asie (figure 13).

Ces symptômes sont apparus sur les feuilles nouvellement émises (F0, F1) après la feuille inoculée sur laquelle aucun symptôme n'a été observé. Ces symptômes étaient visibles de façon irrégulière à la base ou à l'extrémité du limbe et présentaient des différences d'intensité en fonction de l'isolat viral. L'isolat du Pakistan (Pak155/1) a conduit au développement du même type de symptômes que l'isolat témoin SCMV Cam6/1 sur les deux variétés : des raies décolorées au contour bien défini qui ont très vite évolué sur l'ensemble d'un limbe vert foncé, en de larges plages d'un vert clair vif. Tous les autres isolats viraux asiatiques, ainsi que l'isolat SrMV 51/1, ont produit des symptômes discrets sur les deux variétés de canne à sucre : petites raies vert clair à peine visibles au contour mal défini. En conséquence, l'observation de ces symptômes et l'évaluation de leur sévérité était très difficile, particulièrement sur les feuilles les plus âgées.

La gravité et la progression de la maladie ont varié en fonction de l'isolat viral et au cours des huit semaines d'observation des plants de canne à sucre (figures 12 et 13). Deux types d'isolats ont pu être identifiés en fonction des courbes de progression de la maladie sur les variétés FR96029 (essai I) et FR96047 (essai II) et après analyse statistique des AUDPC (comparaison deux à deux selon le test de Tukey) :

- des isolats viraux «très pathogènes» : les isolats du Pakistan (Pak155/1) et du Cameroun SCMV Cam6/1; ils ont tous les deux provoqué des symptômes vifs, facilement lisibles dès la deuxième semaine d'observation ; la maladie a rapidement progressé pour atteindre des IDM proches de 70-80 dans l'essai I, et de 90 dans l'essai II.
- des isolats viraux «moyennement pathogènes» : Ind159/1, Vnm14/1, Lka116/1, SrMV 51/1; Bgd131/1 et Tha151/1 ; les symptômes provoqués par ces isolats sont diffus et sont apparus 14 à 21 jours après inoculation ; la maladie a évolué irrégulièrement (courbe des IDM en dents de scie) pour atteindre, huit semaines après inoculation des variétés FR96029 et FR96047, des valeurs d'IDM comprises entre 4 et 44.

Symptomatologie sur maïs. Des symptômes de mosaïque ont été observés sur les plants de maïs de la variété Golden Cross Bantam inoculés avec les six isolats asiatiques et les isolats témoins SCMV Cam6/1 et SrMV 51/1. Les symptômes de mosaïque étaient visibles sur les premières feuilles émises (F0 ou F1) après la feuille inoculée (F2). Ils sont apparus dès la première semaine après inoculation avec l'isolat Pak155/1, SCMV Cam6/1 et SrMV 51/1 (Annexe IV). Les symptômes provoqués par les autres isolats asiatiques étaient plus discrets et sont apparus plus tard. Tous les isolats asiatiques avaient produit des symptômes (essai I) trois semaines après inoculation. Cependant, le nombre de plants malades était le plus important (50% et plus) avec les isolats Ind159/1, Pak155/1 et Lka116/1. Ils ont également provoqué des symptômes plus sévères, notamment Pak155/1. Les symptômes sur maïs ont uniquement été observés pendant trois semaines après inoculation. En effet, le maïs est une plante à croissance rapide par rapport à la canne à sucre.



Figure 16 : Symptômes de mosaïque sur la variété de sorgho Tx412 inoculée avec deux isolats viraux : à gauche Pak155/1, à droite Bgd131/1.

Tableau 5 : Taille des particules virales originaires d'Asie observées en microscopie électronique (grossissement x 30000)

Classe de taille (nm)	Isolats viraux					
	SCMV Cam 6/1	SrMV 51/1	Bgd131/1	Ind159/1	Lka116/1	Pak155/1
[100-250[194,0 249,5
[250-700[319,5 568,0 582,0 596,0 624,0 651,5 651,5	332,5 346,5 526,5	402,0 526,0 540,0 554,5 609,5
[700-900[790,0	748,5	707,0		734,5 762,0	734,5 734,5
[900-1300[914,5 984,0 1247,0		1039,5 1164,0
Total*	1	1	1	10	5	11

* nombre total de particules observées par isolat.

flexueuse aux dimensions variables (tableau 7 et figures 16, 17, 18). En revanche, aucune particule n'a été observée en microscopie électronique pour les isolats Tha151/1 et Vnm14/1.

Caractérisation sérologique et détection des isolats viraux dans la plante. Les propriétés sérologiques des six isolats asiatiques et des souches SCMV Cam6/1 et SrMV 51/1 ont été analysées par la technique des immunoempreintes de feuilles. Des empreintes foliaires des deux variétés de canne à sucre (FR96029 et FR96047) inoculées avec ces huit isolats viraux ont été effectuées avec la feuille F1, à raison de quinze plantes par isolat. Seul l'isolat viral Pak155/1 et les isolats connus de SCMV et de SrMV ont présenté une réaction sérologique positive avec le sérum AGDIA spécifique des *Potyvirus* et le sérum anti-SCMV-Cameroun. Le sérum anti-SCMV-Inde a uniquement réagi avec l'isolat Ind159/1.

En conséquence, la détection du virus dans les plantes inoculées a uniquement pu être réalisée pour les isolats Pak155/1, SCMV Cam6/1 et SrMV 51/1 (avec le sérum *Potyvirus*-AGDIA) et pour l'isolat Ind159/1 (avec le sérum SCMV-Inde).

La feuille F1 de toutes les plantes inoculées avec Pak155/1 a présenté des symptômes et s'est avérée infectée (tableau 8). L'agent pathogène a été détecté dans toutes les plantes inoculées avec l'isolat Ind159/1. En revanche, près de 50% des feuilles F1 infectées par cet isolat ne présentaient pas de symptômes huit semaines après inoculation (tableau 8).

Caractérisation moléculaire.

Amorces spécifiques de l'espèce virale SCMV : F4R3 (1). Un fragment d'environ 0,9 Kb a été obtenu uniquement pour l'isolat SCMV Cam6/1 et l'isolat Pak155/1. Aucun fragment d'amplification n'a été mis en évidence pour les autres isolats asiatiques et l'isolat SrMV 51/1 ; des bandes aspécifiques de faible intensité et de différentes tailles ont été observées pour tous les isolats viraux, mais aussi pour la canne saine (figure 19).

Amorces spécifiques du genre Potyvirus : oligo1n et oligo2n (19).

Un fragment d'amplification d'environ 0,3 Kb a été obtenu uniquement pour les isolats SCMV Cam6/1, SrMV 51/1 et Pak155/1. Aucune bande n'a été observée pour les cinq autres isolats asiatiques (figure 20).

Discussion

Les six isolats viraux asiatiques sont pathogènes sur les variétés de canne à sucre FR96029 et FR96047, la variété de maïs Golden Cross Bantam et la variété de sorgho Tx412. Ils ont colonisé les plantes hôtes et provoqué des symptômes de mosaïque. Ces résultats n'ont donc pas permis de mettre en évidence un spectre d'hôtes différentiel, comme les hypothèses de départ le supposaient. Cependant, le type de symptôme exprimé, la gravité et la progression de la maladie ont permis de classer les isolats asiatiques en deux groupes :

- un groupe «SCMV» qui comprend l'isolat Pak155/1, tout comme l'isolat connu SCMV Cam6/1. Ces isolats ont provoqué sur canne à sucre et sorgho des chloroses en mosaïque éparses qui se sont rapidement étendues, décolorant ainsi l'ensemble du limbe des feuilles émises après inoculation. De plus, huit semaines après inoculation, la gravité de la maladie était importante comme en attestent les IDM élevés. La progression de la maladie, assez régulière et modérée sur canne à sucre, était en revanche très rapide sur sorgho.

- un groupe «Asie» auquel appartiennent les cinq autres isolats viraux asiatiques. Ces isolats ont causé des symptômes discrets. La maladie a progressé irrégulièrement sur canne à sucre et sorgho, avec des pics d'IDM plus importants entre deux dates de lecture : entre les semaines 4 et 5 (figures 12 et 14) et les semaines 2 et 3 (figures 13 et 15).

Ces résultats surprenants pourraient être reliés à une élévation brutale de la température (>30°C) dans la salle de culture quatre et dix sept jours après l'inoculation des plants de sorghos et de canne à sucre, respectivement dans les essais II et I. Un phénomène similaire a déjà été rapporté dans la première partie de cette étude avec des isolats africains de SCMV (cf première partie). Ce choc climatique pourrait constituer un facteur favorable à l'expression des symptômes, soit en

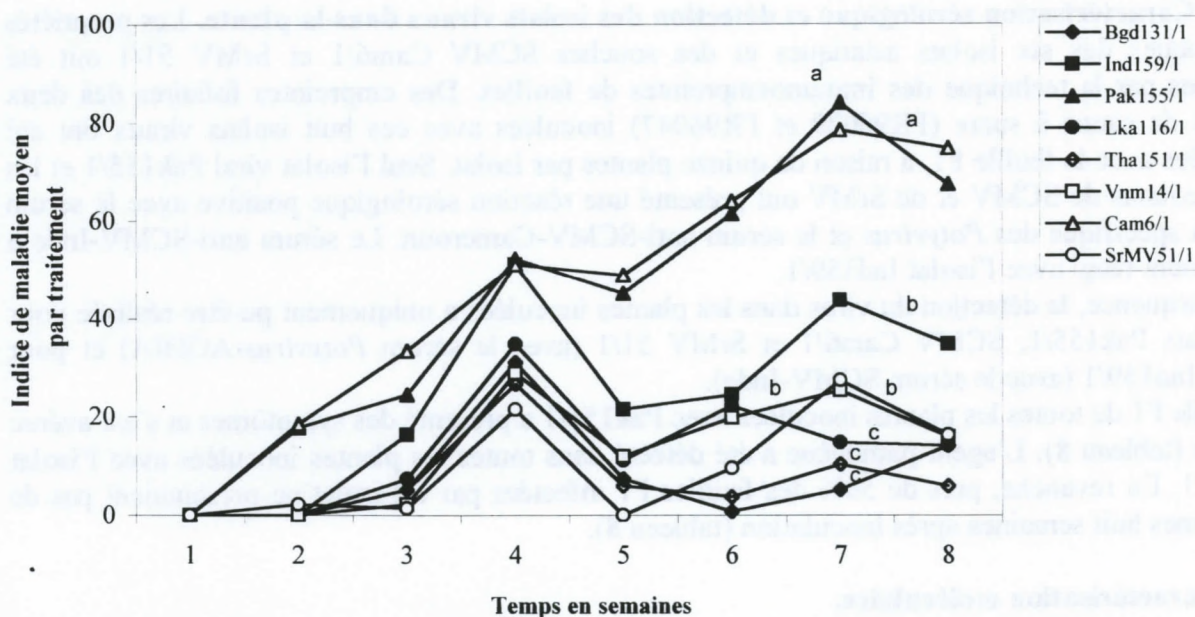


Figure 12 * : Progression de la maladie chez la variété de canne à sucre FR96029 inoculée avec six isolats viraux asiatiques responsables de symptômes de mosaïque (essai I, inoculation du 13/04/01).

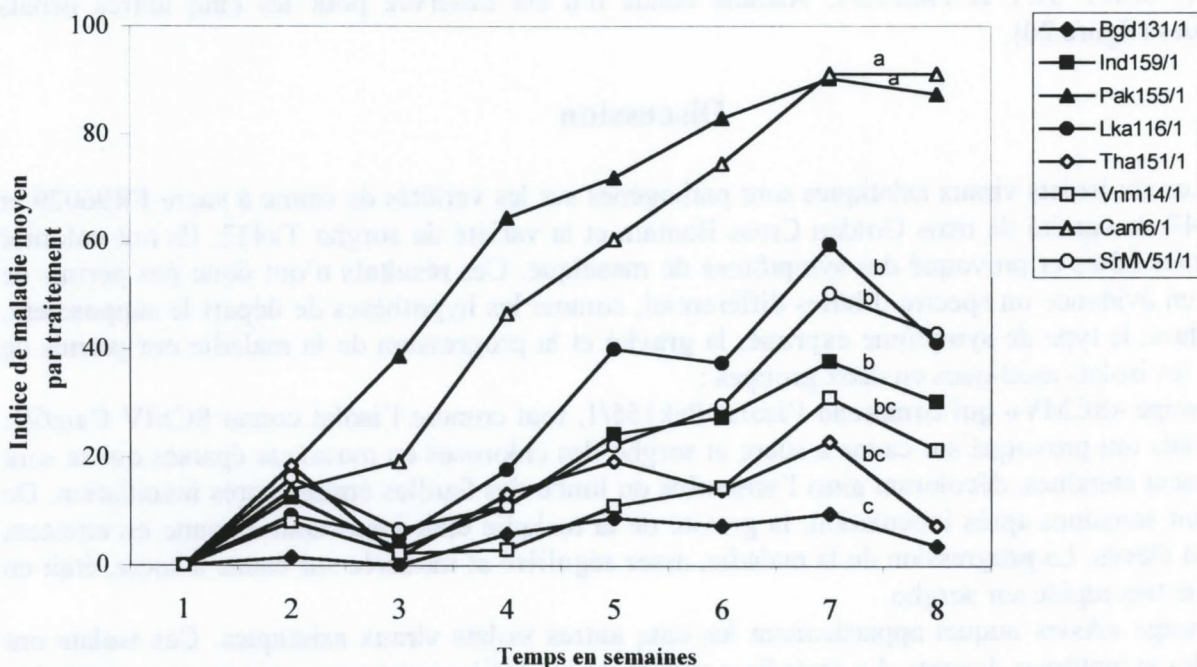


Figure 13* : Progression de la maladie chez la variété de canne à sucre FR9047 inoculée avec six isolats viraux asiatiques responsables de symptômes de mosaïque (essai II, inoculation du 24/04/01).

* Les AUDPC des courbes surmontées de la même lettre ne sont pas différentes à $P = 0,05$ selon l'analyse de variance. Cette dernière a montré un effet isolat à $P = 0,001$.

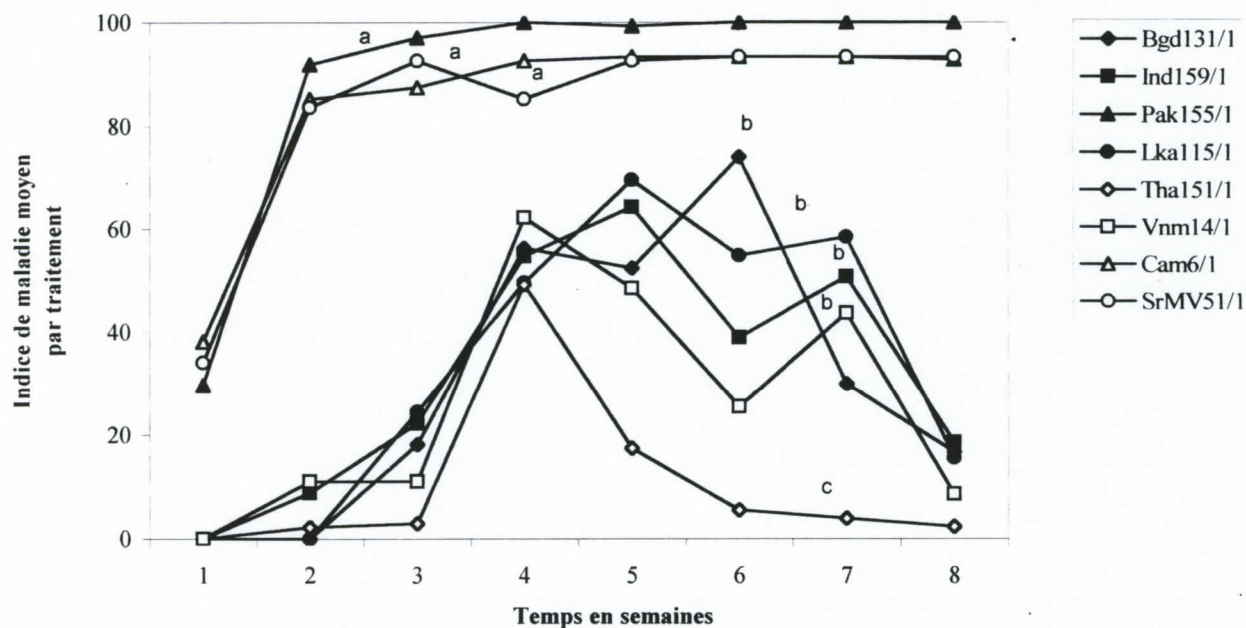


Figure 14 * : Progression de la maladie chez la variété Tx412 de sorgho inoculée avec des isolats viraux asiatiques responsables de symptômes de mosaïque (essai I, inoculation du 13.04.01).

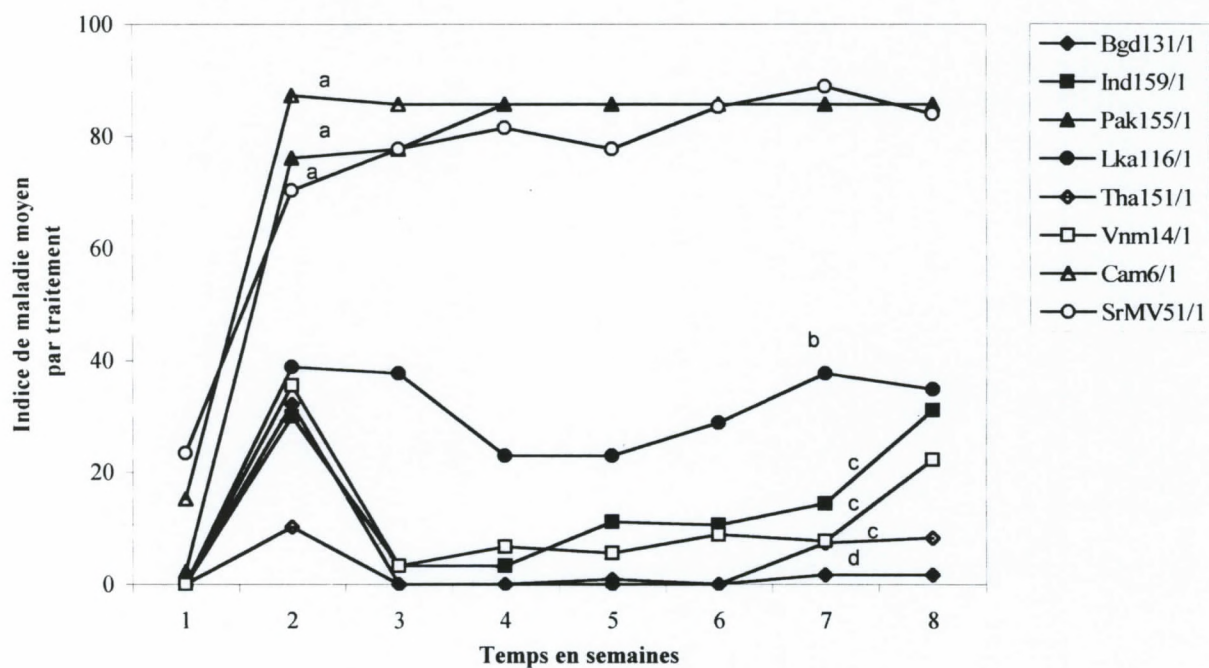


Figure 15 * : Progression de la maladie chez la variété Tx412 de sorgho inoculée avec six isolats viraux asiatiques responsables de symptômes de mosaïque (essai II, inoculation 24.04.01).

* Les AUDPC des courbes surmontées de la même lettre ne sont pas différentes à $P = 0,05$ selon l'analyse de variance. Cette dernière a montré un effet isolat à $P = 0,001$.

augmentant le pouvoir infectieux des particules virales, soit en abaissant le niveau de résistance de la plante.

La plupart des *Potyvirus* présentent des particules virales filamenteuses de 11-12 nm de large et 680-900 nm de long (25). Les tailles des isolats viraux asiatiques caractérisés au cours de cette étude étaient similaires à celles attribuées aux *Potyvirus*, malgré une grande hétérogénéité (190 à 1150 nm). Les particules de petite taille (<680 nm) pourraient provenir d'une fragmentation lors de l'expérimentation, alors que les particules de grandes taille (>900 nm) pourraient correspondre à la juxtaposition de plusieurs particules virales.

Les relations immunologiques entre les différents membres du genre *Potyvirus* sont extrêmement complexes et les souches d'un même *Potyvirus* peuvent être sérologiquement éloignées (24,25). La protéine de capsid des *Potyvirus* présente une structuration particulière car les extrémités N et C terminales sont exprimées à la surface des particules virales. Ces extrémités constituent les principales régions immunologiques de la particule : la partie N terminale contient la majorité des épitopes spécifiques d'un virus ou d'une souche, alors que la partie centrale (core) et l'extrémité C terminale sont des régions conservées qui contiennent des épitopes souvent présents chez les *Potyvirus* (26). Trois groupes d'isolats responsables de mosaïque ont été mis en évidence au cours de notre étude sérologique. Un groupe «*Potyvirus*» auquel appartiennent l'isolat viral Pak155/1 et les isolats connus pour appartenir au genre *Potyvirus* (SCMV Cam6/1 et SrMV 51/1) ; un deuxième groupe appelé «isolats asiatiques» auquel appartiennent Bgd131/1, Lka1161/1, Tha151/1 et Vnm14/1. Ces isolats n'ont réagi avec aucun des trois sérums utilisés (anti-*Potyvirus*, anti-SCMV-Cameroun et anti SCMV-Inde). Un troisième groupe, «SCMV-Inde» est représenté uniquement par l'isolat d'Inde (Ind159/1).

La caractérisation moléculaire est actuellement le critère ultime pour assigner un virus à un groupe taxonomique. Le séquençage du génome viral, et particulièrement celui de la protéine de capsid (région très conservée) d'un groupe viral, est le critère le plus utilisé et le plus fiable pour la classification taxonomique (6). Plusieurs couples d'amorces ont été définis ces dernières années pour identifier spécifiquement, par RT-PCR, les isolats viraux appartenant aux espèces SCMV et SrMV (31), au genre *Potyvirus* (19), à la famille *Potyviridae* (8), voire spécifiquement aux *Potyvirus* des Graminées (19). Au cours de notre étude, aucun produit d'amplification n'a été obtenu pour les isolats viraux originaires d'Asie, sauf pour l'isolat Pak155/1 avec deux couples d'amorces spécifiques du SCMV ou du genre *Potyvirus*. Des résultats identiques ont été obtenus en 2001 au CIRAD avec d'autres isolats viraux originaires d'Asie (Bangladesh, Sri-Lanka, Thaïlande, Vietnam) et d'autres couples d'amorces (Chatenet, comm. orale) : SrMV F3-SrMV R3 spécifiques du SrMV (31) ; D1000-P2 spécifique du genre *Potyvirus* (17) ; Potyvirid primer 1-Potyvirid primer 2 spécifique de la famille *Potyviridae* (8) ; Carla uni-oligo d(T) spécifique des *Carlavirus* (Marie-Jeanne, comm. orale).

Etant donné que Pak155/1 i) produit des symptômes de mosaïque sur canne à sucre, maïs et sorgho ; ii) réagit avec un sérum anti-*Potyvirus* et un sérum anti-SCMV, iii) est détecté par RT-PCR à l'aide d'amorces spécifiques de l'espèce SCMV et du genre *Potyvirus*, on peut affirmer que cet isolat viral du Pakistan appartient bien à l'espèce SCMV. En revanche, bien que les autres isolats viraux asiatiques (Bgd131/1, Ind159/1, Lka116/1, Tha151/1, Vnm14/1) présentent des caractéristiques morphologiques de *Potyvirus* (forme et taille) et provoquent des symptômes de mosaïque sur canne à sucre, maïs et sorgho, on ne peut conclure à ce jour à leur appartenance au genre *Potyvirus*, voire à la famille *Potyviridae*. Ces isolats asiatiques pourraient appartenir à plusieurs familles de virus filamenteux, ou même constituer une espèce virale non décrite à ce jour. Des études complémentaires sont par conséquent nécessaires pour préciser leur position taxonomique. Le comportement de l'isolat Ind159/1 est particulier. En effet, cet isolat n'a pas réagi avec les sérums anti-*Potyvirus* ou anti-SCMV-Cameroun, mais a réagi avec le sérum SCMV-Inde. Les anticorps spécifiques de ce sérum SCMV-Inde ont été produits en Inde à l'aide d'un isolat viral prélevé localement et identifié comme appartenant au SCMV sur la base restreinte des propriétés biologiques (taille des particules et le spectre d'hôte (21). Etant donné qu'aucun autre isolat asiatique, ni l'isolat connu de SCMV, n'a réagi avec ce sérum, il semblerait être très spécifique du virus de la mosaïque en Inde. Rao (comm. pers.) a cependant obtenu une réaction positive en utilisant le sérum en DAC-ELISA avec des isolats du Pakistan et du Sri-Lanka, mais pas avec

Tableau 6 : Détection de virus de la mosaïque par la technique des immunoempreintes dans des plants de canne à sucre avec ou sans symptômes.

Pays d'origine	Isolat viral	Variété de canne à sucre hôte	Nombre de plantes infectées /nombre de plantes avec symptômes	Nombre de plantes infectées/nombre de plants sans symptômes
Pakistan	Pak155/1	FR 96 029	15/15	-
Cameroun	Cam6/1	FR 96 029	15/15	-
U.S.A	SrMV 51/1	FR 96 029	7/7	5/5
Inde	Ind159/1	FR 96 029	8/8	7/7
Pakistan	Pak155/1	FR 96 029	15/15	-
Cameroun	Cam6/1	FR 96 029	14/14	1/1
U.S.A	SrMV 51/1	FR 96 047	7/9	2/2
Inde	Ind159/1	FR 96 047	8/8	7/7

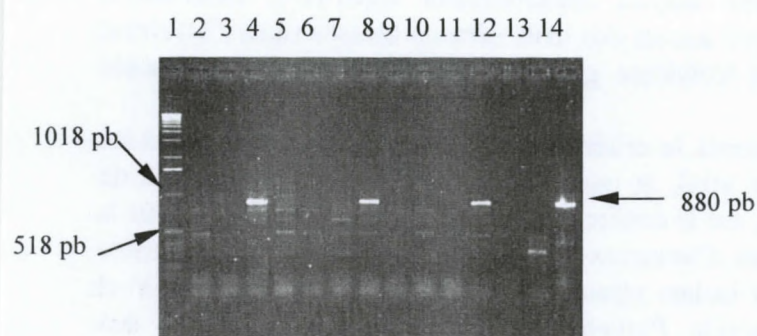


Fig 19 : Profils électrophorétiques des produits d'amplification obtenus avec les amorces SCMV F4-SCMV R3.

Pistes : 1, marqueur de taille 1Kb ; 2, Bgd131/1 ; 3, Ind159/1 ; 4, Pak155/1 ; 5, Lka116/1 ; 6, Tha151/1 ; 7, Vnm14/1 ; 8, SCMV Cam6/1 ; 9, SrMV 51/1 ; 10, canne saine B46364 ; 11, témoin négatif de RT-PCR mélange réactionnel sans ADN ; 12, SCMV Cam6/1 ; 13, canne saine B46364 ; 14, produit témoin positif PCR SCMV-Cam6/1 amplifié avec les amorces oligo1 et oligo2 ; 15, produit témoin positif PCR SCMV Cam6/1 amplifié avec les amorces SCMV F4-SCMV R3.

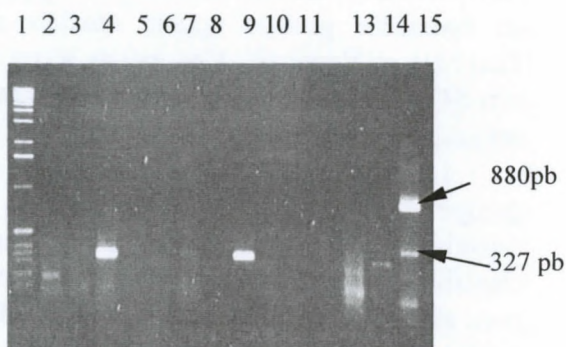


Fig 20 : Profils électrophorétiques des produits d'amplification obtenus avec les amorces oligo 1n et oligo 2n.

Pistes : 1, marqueur de taille 1Kb ; 2, Bgd131/1 ; 3, Ind159/1 ; 4, Pak155/1 ; 5, Lka116/1 ; 6, Tha151/1 ; 7, SCMV Cam6/1 ; 8, Vnm14/1 ; 9, SrMV 51/1 ; 10, canne saine B46364 ; 11, témoin négatif de RT-PCR mélange réactionnel sans ADN ; 13, canne saine B46364 ; 14, produit témoin positif PCR SCMV Cam6/1 amplifié avec les amorces oligo1n et oligo2n ; 15, produit témoin positif PCR SCMV Cam6/1 amplifié avec les amorces SCMV F4-SCMV R3.

différents membres du SCMV «subgroup» (SCMV-MB, SCMV-H, I, et JGMV) et d'autres *Potyvirus* comme le PVY. Au vu de ces résultats, il pourrait exister en Asie des sérotypes différents de SCMV voire d'autres virus encore méconnus. Hema rapporta en 1997 (11) l'existence probable d'un virus responsable de symptômes de mosaïque sur canne à sucre en Inde mais distinct du SCMV. En effet, ce virus ne présentait pas de réaction avec des antisérums de différentes souches de SCMV et de MDMV. L'analyse des propriétés moléculaires de ce virus révéla qu'il n'appartenait pas au SCMV, mais à l'espèce *Sugarcane streak mosaic virus* (SCSMV). Ce dernier est un nouveau virus, déjà mis en évidence au Pakistan (10), et qui appartiendrait au genre *Tritimovirus*, dans la famille des *Potyviridae* (11,12). L'isolat d'Inde (Ind159/1) caractérisé au cours de notre étude pourrait appartenir à cette espèce. En effet, les amorces oligo1n et oligo2n spécifiques du genre *Potyvirus* amplifient une région très conservée du centre de la protéine de capsid de la plupart des *Potyvirus* comprise entre les motifs aminoacides MVWCIEEN et QMKAAA (17). Or, ce motif est absent chez le SCSMV et notamment chez l'isolat SCSMV-AP (22). Ceci pourrait expliquer l'absence de produit d'amplification pour l'isolat originaire d'Inde (Ind159/1) avec les amorces spécifiques du genre *Potyvirus*.

Cette étude a contribué à la caractérisation d'isolats viraux responsables de la mosaïque de la canne à sucre. La caractérisation du pouvoir pathogène de six isolats viraux représentant la diversité génétique du SCMV au Cameroun et au Congo n'a pas permis de mettre en évidence une relation entre l'appartenance à un groupe phylogénétique et le caractère qualitatif et/ou quantitatif du pouvoir pathogène. Certains résultats sont en faveur d'interactions variété-isolat (essais I et II) mais ils sont remis en cause par d'autres (essai III). Ces résultats divergents pourraient être liés à différents facteurs tels que des variations de température, d'inoculum et de matériel végétal. Il importe donc d'étudier l'effet de la température sur le temps d'apparition des symptômes et sur la multiplication virale du SCMV *in planta*. De même, une quantification précise de la charge virale des extraits foliaires servant à produire l'inoculum permettrait une meilleure uniformisation du nombre de particules virales conduisant à l'infection. Celle-ci pourrait être définie par le dosage des protéines du précipité antigène/anticorps selon méthode de Lowry ou par le point de dilution limite. Ce dernier correspond à la plus grande dilution d'un extrait virosé pour laquelle on obtient encore une infection. Il présente l'avantage de ne prendre en compte que les particules infectieuses. Par ailleurs, la concentration en antigène dépend aussi de la croissance de la plante et donc de la température. Ces données permettraient de définir certains facteurs écologiques particulièrement favorables à l'expression et la progression de la maladie.

La caractérisation des propriétés biologiques, morphologiques, sérologiques et moléculaires d'isolats viraux originaires d'Asie a permis de préciser la position taxonomique de l'isolat originaire du Pakistan (Pak155/1). Celui-ci appartient au genre *Potyvirus* et à l'espèce SCMV. L'appartenance des isolats du Bangladesh, de l'Inde, du Sri-Lanka, de Thaïlande et du Vietnam à la famille des *Potyviridae* n'est pas à exclure, mais les résultats obtenus à ce jour ne nous permettent pas de conclure. Des études complémentaires devront être réalisées : purification des virus, production et extraction d'ADNc, clonage à l'aveugle, séquençage et comparaison avec des séquences connues disponibles dans les banques de données.

ANNEXE I : Immunoempreintes

Le limbe des feuilles de canne à sucre est éliminé pour ne conserver que la nervure centrale puis une section transversale de cette dernière est réalisée avec un scalpel stérile. La nervure est alors appliquée fortement sur une membrane de nitrocellulose (Protan BA 85 cellulosenitrate, 0.45 μ m, Schleicher et Schuell) en évitant une pression excessive.

Révélation de la membrane. L'ensemble des produits utilisés pour la révélation de la membrane proviennent de chez *Sigma*. Une étape de saturation dans un tampon de blocage contenant du TBS-T [(50 mM, 50 mM de NaCl) à pH 7,5 et 0,05% de Tween-20] et 5% de BSA (Bovine Serum Albumine) est réalisée afin de réduire la fixation aspécifique des anticorps. La membrane est agitée légèrement et placée à 37°C pendant 45 minutes, puis rincée pendant 5 minutes dans du tampon TBS-T. Elle est ensuite mise à incuber pendant une nuit à 4°C dans le sérum anti-mosaïque SCMV (laboratoire de Phytrop, CIRAD Montpellier) dilué au 1/10 000 dans le tampon TBS-T avec 1% de BSA. La membrane est rincée trois fois pendant 5 minutes dans le tampon TBS-T, puis placée pendant 2 heures à 37°C dans le conjugué commercial phosphatase alcaline (GAR A8025) dilué au 1/1000 dans le TBS-T avec 1% de BSA. La membrane, rincée 4 fois pendant 5 minutes dans du tampon TBS-T, est essorée légèrement sur le papier filtre. Elle est mise à tremper dans le substrat (24g/l de tampon Tris à pH 9,1, 0,3 g de naphthol AS phosphate dissout dans 5 ml du N,N diméthylformamide, 5ml/l de $MgCl_2$ à 0,1M et 0,1 g/l de Fast Blue) pendant 5 à 10 minutes à température ambiante. La membrane est alors rincée à l'eau courante et une coloration bleu-violet, visible à l'œil nu témoigne de la présence du virus dans l'échantillon foliaire. Une observation plus précise est faite sous la loupe binoculaire (x 40) pour détecter la présence du SCMV dans les vaisseaux foliaires.

ANNEX II : Methode du «Leaf dip»

Un échantillon de feuille d'environ 1 cm² est dilacéré avec une lame de rasoir dans une goutte d'eau distillée. Une goutte de cet extrait végétal en suspension est déposé à l'aide d'une pipette Pasteur sur une grille (prête à l'emploi) recouverte d'une membrane de Formvar et de carbone. Vingt secondes après le dépôt, l'excès de suspension est prélevé avec la pipette et un papier filtre. Une goutte de solution contrastante d'acide phosphotungstique (PTA) à 1% (pH 7) est déposée sur la grille et maintenue pendant vingt secondes. L'excès de PTA est alors prélevé avec la pipette et un papier filtre. La grille est mise à sécher 10 minutes à température ambiante. L'observation au microscope électronique est réalisée au grossissement x 38000.

ANNEXE III : Méthodes moléculaires

Extraction de l'ARN total. L'extraction de l'ARN total de feuilles présentant des symptômes de mosaïque a été réalisée à l'aide du Kit RNeasy plant[®] (Qiagen) : 500mg du matériel végétal (limbe et nervure) conservé à -80°C est broyé dans de l'azote liquide dans des mortiers préalablement refroidis. A 100mg du broyat sont ajoutés 450 μ l de tampon RLT contenant du β mercaptoéthanol (10 μ l/ml). Le lysat obtenu est déposé sur une colonne QIAshredder spin et centrifugé pendant deux minutes à 15300 g afin d'éliminer les débris végétaux. La fraction filtrée est placée dans un tube Eppendorf de 1,5 ml et additionnée de 225 μ l d'éthanol froid à 96-100%. Le mélange est introduit dans une colonne RNeasyminispin puis centrifugé pendant 15 secondes à 8000 g. Cette étape permet la fixation de l'ARN à la membrane de silicagel contenue dans la colonne. La colonne est lavée successivement à l'aide de 700 μ l de tampon RW1 (centrifugation pendant 15 secondes à 8000 g), 500 μ l de tampon RPE (centrifugation pendant 15 secondes à 8000 g) et 500 μ l de tampon RPE (centrifugation pendant 2 minutes 15300 g). La colonne est alors reprise avec 45 μ l d'eau DEPC et centrifugée pendant 60 secondes à 8000 g. L'ARN élué est conservé au congélateur à -20°C.

Annexe III (suite)

Protocole de RT-PCR pour l'amplification d'un fragment génomique de 327 pb codant la protéine de capsid des *Potyvirus* (19).

-Mélange réactionnel (par échantillon) pour la dénaturation puis la RT à partir de l'ARN extrait avec le kit RNeasy Qiagen :

Dénaturation

ARN	1,0 µl
Oligonucléotides : random hexamers (50ng/µl)	2,5 µl
Eau DEPC	7,5 µl

Thermocycleur : 11µl de mélange mis à incuber pendant 10 minutes à 70°C.

Le mélange est placé dans la glace pendant 5 minutes.

RT

Tampon RT 5X (Gibco)	4,0 µl
DTT (0,1 M) (Gibco)	2,0 µl
Mélange dNTPs (10 mM)	1,0 µl
DMSO	1,0 µl
RNase inhibiteur (40U/ml)	0,0 µl
M.MLV.RT (200U/ µl)	0,5 µl
ARN dénaturé	11,0 µl

Thermocycleur : incubation pendant 10 minutes à 30°C, puis à 30 minutes à 42°C.

- Mélange réactionnel pour la PCR (par échantillon de 50µl) :

cDNA	1,0 µl
oligo 1n (forward primer) (100µM)	0,15 µl
oligo 2n (reverse primer) (100µM)	0,15 µl
Tampon 10X (Sigma)	4,0 µl
MgCL ₂ (25mM) (Sigma)	1,5 µl
Mélange dNTPs (10 mM) (Gibco)	1,0 µl
DMSO	1,0 µl
Taq polymérase (Sigma)	0,8 µl
Eau q.s.p. 50 µl (Sigma)	40,4 µl
2 gouttes d'huile	

Conditions d'amplification :

2 cycles : 5 minutes à 94°C, 2 minutes à 50°C, 50 secondes à 72°C ;

30 cycles : 45 secondes à 94°C, 2 minutes à 50°C, 50 secondes à 72°C ;

1 cycle : 10 minutes à 72°C et température maintenue à 10°C.

Amorces utilisées pour la RT-PCR :

oligo 1n : 5' ATGGTHTGGTGYATHGARAAYGG 3'

oligo 2n : 5' TGCTGCKGCGYTTTCATYTG 3'

Annexe III (suite et fin)

Protocole de RT-PCR pour amplification d'un fragment de 800-900 pb du SCMV (1).

- Le mélange réactionnel (par échantillon) pour la RT-PCR a été réalisé avec le kit RT-PCR 100 (Sigma):

Tampon 10 X	2,5 µl
MgCL ₂ (25 mM)	2,0 µl
Mélange dNTPs	0,5 µl
RNase inhibitor	0,5 µl
Amorce SCMV F4	0,5 µl
Amorce SCMV R3	0,25 µl
Reverse Transcriptase	0,5 µl
Taq polymérase	0,125 µl
Eau	17,88 µl
ARN	0,5 µl
2 gouttes d'huile	

Conditions d'amplification.

- 1 cycle : incubation pendant 45 minutes à 45°C,
- 1 cycle : 2 minutes à 95°C
- 35 cycles : 1 minute à 95°C, 1 minute à 60°C et 1 minute à 72°C,
- 1 cycle de : 5 minutes à 72°C puis descente rapide et maintien à 10°C.

Amorces utilisées :

SCMV F4 : 5'GTTTTYCACCAAGCTGCAACAGTC3'

SCMV R3 : 5'AGCTGTGTGTCTCTCTGTATTCTC3'

Visualisation des fragments d'ADN amplifiés par électrophorèse. Un gel d'agarose standard (*Sigma*) à 1% dans du tampon TBE [(0,10 M de Tris Base (*Sigma*), 0,09 M d'acide borique (*Sigma*)] et 0,001 M d'EDTA en solution (*Sigma*) est utilisé. 9 µl d'amplifiat d'ADN et 1 µl de bleu de charge (6X) [(40% de saccharose (*Sigma*) et 0,25% de bleu de bromophénol)] sont déposés dans chaque puit et 10 µl de marqueur de poids moléculaire à 1Kb (phage lambda) sont utilisés pour déterminer la taille des fragments amplifiés. La migration est réalisée à une tension de 85V dans du tampon TBE 1X. La révélation du gel, après 5 minutes d'immersion dans un bain de bromure d'éthidium (10 mg/ml) suivie d'un rinçage pendant 10 minutes à l'eau, est effectuée sous lumière U.V.

Annexe IV

Annexe IV.1 : Pathogénie sur maïs (variété Golden Cross Bantam) de six isolats viraux responsables de la mosaïque de la canne à sucre en Asie (essai I)

Origine géographique	Isolat	Nombres de plantes avec symptômes/nombre de plantes inoculées		
		7 jours après inoculation	14 jours après inoculation	21 jours après inoculation
Bangladesh	Bgd131/1	0/15	1/15	1/15
Inde	Ind159/1	0/15	1/15	12/14
Pakistan	Pak155/1	14/15	13/14	9/14
Sri-Lanka	Lka116/1	0/15	0/15	13/15
Thaïlande	Tha151/1	0/15	1/15	4/15
Vietnam	Vnm14/1	0/15	1/15	7/15
Cameroun	Cam6/1	15/15	5/15	13/15
USA-Louisiane	SrMV 51/1	10/15	3/15	8/15

Annexe IV.2 : Pathogénie sur maïs (variété Golden Cross Bantam) de six isolats viraux responsables de la mosaïque de la canne à sucre en Asie (essai II)

Origine géographique	Isolat	Nombres de plantes avec symptômes/nombre de plantes inoculées		
		7 jours après inoculation	14 jours après inoculation*	21 jours après inoculation*
Bangladesh	Bgd131/1	0/15	0/9	0/9
Inde	Ind159/1	2/15	1/10	2/8
Pakistan	Pak155/1	3/15	1/11	-
Sri-Lanka	Lka116/1	0/15	1/8	1/2
Thaïlande	Tha151/1	0/15	1/13	0/7
Vietnam	Vnm14/1	0/15	1/14	1/9
Cameroun	Cam6/1	7/15	6/8	2/6
USA-Louisiane	SrMV 51/1	6/15	5/8	3/5

* Une mortalité importante des maïs au cours de l'expérimentation explique pourquoi le nombre de plantes observées est inférieur à 15.

Empreinte de feuille saine



Empreinte de feuille infectée par le SCMV

Figure 8 : Révélation des immunoempreintes de nervures foliaires de canne à sucre : coloration bleue de l'ensemble de l'empreinte de la nervure infectée par le SCMV



Figure 16 : Particule virale de SCMV Cam6/1 observée au microscope électronique (790 nm x 11 nm)



Figure 17 : Aspect filamenteux d'une particule de l'isolat Pak155/1 (609.8 nm x 10 nm)

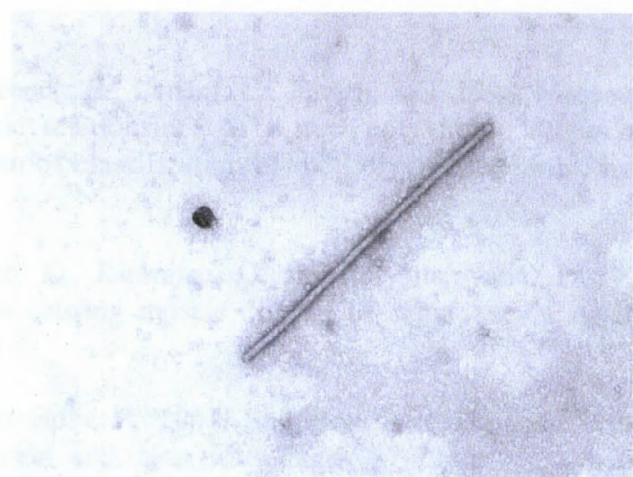


Figure 18 : Aspect filamenteux d'une particule virale de l'isolat Ind159/1 (596 nm x 10 nm).

Références bibliographiques

- 1 Alegria, O.M., Royer, M., Bousalem, M., Chatenet, M., Peterschmitt, M., Girard, J.C., Rott, P. 2001. Diversité génétique du *Sugarcane mosaic virus* au Congo et au Cameroun. Pages 23 in : Huitièmes rencontres en virologie végétale. Aussois , France.
- 2 Atreya, C.D., Raccach, B. and Pirone, T.P. 1990. A point in the coat protein abolishes aphid transmission of a potyvirus. *Virology* 178 : 161-165.
- 3 Baudin, P. 1976. Etude d'une souche du virus de la mosaïque de la canne à sucre. Pages 41-51 in : Mémoire pour l'obtention du titre de Docteur-Ingénieur. Université Louis Pasteur, de Strasbourg, France.
- 4 Bousalem, M., Douzery, E.J.P. and Fargette, D. 2000. High genetic diversity, distant phylogenetic relationships and intraspecies recombination events among natural populations of *Yam mosaic virus* : a contribution to understanding potyvirus evolution. *J. General Virology* 81 : 243-255.
- 5 F.A.O. 1999. FAOSTAT Database Gateway. <http://apps.fao.org/lim> 500.
- 6 Fauquet, C., Déjardin, J. and Thouvenel, J.C. 1986. Evidence that the amino acid composition of the particle proteins of plant viruses is characteristic of the virus group. I. Multidimensional classification of plant viruses. *Intervirology* 25 : 1-13.
- 7 Franck, A., Hirth, L. 1972. Isolement d'une propriété thermophile du virus de la mosaïque du luzerne. *C.R. Acad. Sc. Paris* 274 : 745-800.
- 8 Gibbs, A. and Mackenzie, A., 1997. A primer for amplifying part of the genome of all potyvirids by RT-PCR. *J. Virol. Methods* 63 : 9-16.
- 9 Grisham, M.P. 2000. Mosaic. Pages 249-254 in: A guide to sugarcane diseases. Rott, P., Bailey, R.A., Comstock, J.C., Croft, B.J., Salem, A.S eds. Montpellier, La Librairie du CIRAD, France.
- 10 Hall, J.S., Adams, B., Parsons, T.J., French, R., Lane, L.C., Jensen, S.G. 1998. Molecular cloning, sequencing, and phylogenetic relationships of a new potyvirus : *Sugarcane streak mosaic virus*, and a reevaluation of classification of the Potyviridae. *Mol. Phylo. Evol.* 10 : 323-332.
- 11 Hema, M., Sreenivasulu, P., Gopinath, K., Kiranmai, G. and Satyanarayana, T. 1997. Partial characterization of a Potyvirus causing mosaic disease of sugarcane in Andhra Pradesh. *Indian J. Virol.* 144: 479-490.
- 12 Hema, M., Savithri, H.S. and Sreenivasulu, P. 2001. Sugarcane streak mosaic virus: occurrence, purification, characterization and detection. Pages 37-72 in : Sugarcane Pathology Virus and Phytoplasma Diseases, vol II , Rao, G.P., Ford, R.E., Tosic, M. and Teakle, D.S. eds. (sous-presse).

- 13 Hollings, M., and Brunt, A.A. 1981. Potyvirus. Pages 731-807 in: Handbook of plant virus infections: comparative diagnosis. Kurstak, E., ed. Elsevier North-Holland, Amsterdam.
- 14 Hollings, M., and Brunt, A.A. 1981. Potyvirus group. C.M.I./A.A.B. Descriptions of plant viruses No 245, Association of Applied Biologists, Kew, Surrey, UK.
- 15 Kassanis, B., 1957. Effect of changing temperatures on plant virus diseases. Adv. in Virus Res. 4: 455-470.
- 16 Koike, H., and Gillaspie, A.G. Jr. 1989. Mosaic. in: Diseases of sugarcane. Pages 301-302 in : Major diseases. Ricaud, C., Egan, B.T., Gillaspie, A.G. Jr. et Huges, C.G. eds. Elsevier Science Publishers B.V. Amsterdam, the Netherlands.
- 17 Langeveld, S.A., Dore, J.M., Memelink, J., Derks., A.F.L.M., Van der Vlugt, C.I.M., Asjes, C.J. and Bol, J.F. 1991. Identification of potyviruses using the polymerase chain reaction with degenerate primers. J. of Gen. Viro.72: 1531-1541.
- 18 Lebeurier, G., Hirth, L. 1966. Effect of elevated temperatures on the development of two strains of tobacco mosaic virus. Virology 29 : 385-395.
- 19 Marie-Jeanne, V., Ioos, R., Peyre, J., Alliot, B. and Signoret, P. 2000. Differentiation of Poacea potyviruses by RT-PCR and restriction analysis. Pages 1-16 in press. UFR de biologie et Pathologie végétales, ENSA-INRA, Montpellier, France.
- 20 Minitab 13.31. Bureau en France Minitab SARL. bienvenue@minitab.fr.
- 21 Rao, G.P. Jain, R.K. and Varma, A. 1998. Characterization and purification of an Indian isolate of sugarcane mosaic *Potyvirus*. Sugar Cane 1 : 8-10.
- 22 Salm, S.N., Ray, M.E.C, Robertson, N.L., French, R., Robenstein, F. and Schubert, J. 1996. Molecular cloning and nucleotide sequence of the partial genomes of agropyron and hordeum mosaic viruses, two members of the Rymovirus genus in the taxonomic family *Potyviridae*. Arch. Virol 141 : 2237-2242.
- 23 Schenck, S., Hu, J.S., Lockhart, B.E.L. 1997. Use of tissue blot immunoassay to determine the distribution of Sugarcane yellow leaf virus in Hawaii. Sugarcane 4 : 5-8.
- 24 Shukla, D.D., Tomic, M., Jilka, J., Ford, R.E., Toler, R.W., Langham, M.A.C. 1989. Taxonomy of Potyviruses infecting maize, sorghum and sugarcane in Australia and the United States as determined by reactivities of polyclonal antibodies directed towards virus-specific N-termini of coat proteins. Phytopathology 79 : 223-229.
- 25 Shukla, D.D., Frenkel, M.J., Mc Kern, N.M., Ward, C.W., Jilka, J., Tomic, M., and Ford, R.E. 1992. Present status of sugarcane mosaic subgroup of *Potyviruses*. Arch. Virol. [suppl 5]: 363-373.
- 26 Shukla, D.D., and Ward, C.W. 1989. Structure of potyvirus coat proteins and its application in the taxonomy of the Potyvirus group. Pages 273-309 in : Advances in virus research, vol 36. Academic Press, Inc. Australia.

- 27 Shukla, D.D, Ward, C.W. and Brunt, A.A 1994. Pages 1-397 in :The Potyviridae. CAB International, Wallingford, UK.
- 28 Teakle, D.S., Shukla, D.D. and Ford, R.E. 1989. Sugarcane mosaic virus. AAB Descriptions of Plant Viruses No. 342.
- 29 Tu, J.C., and Ford, R.E, 1969. Effect of temperature on maize dwarf mosaic virus infection, incubation, and multiplication in corn. *Phytopathology* 59: 699-702.
- 30 Van Der Planck, J.E. 1968. Pages 1-206 in : Disease resistance in plants. Academic Press, N.Y.and London.
- 31 Yang, Z.N., and Mirkov, T.E. 1997. Sequence and relationships of sugarcane mosaic and sorghum mosaic virus strains and development of RT-PCR-based-RFLPs for strain discrimination. *Phytopathology* 87: 932-939.